

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU (BIGNONIACEAE)**

**Alfenas/MG
2009**

CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA

**ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS
DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU (BIGNONIACEAE)**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos.

**Alfenas/MG
2010**

CLÁUDIA QUINTINO DA ROCHA

ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *Arrabidaea brachypoda* (DC.) BUREAU (BIGNONIACEAE)

A banca examinadora abaixo assinada aprova o manuscrito apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em: 25-02-2010

Prof^o. Dr. Wagner Vilegas (Titular 1)

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP-Araraquara

Prof^o. Dra. Marisi Gomes Soares (Titular 2)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG

Prof^o. Dra. Lucienir Pains Duarte (Suplente 1)

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

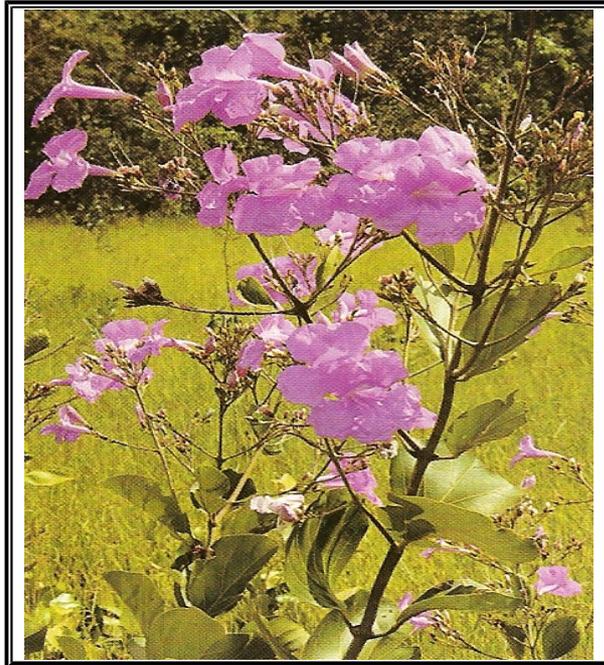
Prof^o. Dra. Tati Ishikawa (Suplente 2)

Instituição: Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG

Essa Dissertação é dedicada ao meu pai Valmir, à minha querida mãe Ademilde e aos meus irmãos, Ademir, Ricardo e Fábio Júnior, que com muito amor, souberam me ensinar o verdadeiro valor da luta e da conquista.

AGRADECIMENTOS

- ✓ *A Deus por ter iluminado meu caminho em todos os momentos de minha vida e por ter me concedido o dom da sabedoria.*
- ✓ *Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Henrique dos Santos, meu agradecimento mais que especial, pelo apoio, compreensão. Sua confiança e orientação foram fonte de meu bem estar no LFQM e de êxito neste trabalho. Muito obrigada.*
- ✓ *Aos professores do Curso de Pós Graduação em Química, por todo o ensino, dedicação, em especial a professora Márcia Paranho Veloso, professor Cláudio Viegas Júnior e professora Marisi Gomes Soares pela acolhida no LFQM.*
- ✓ *Aos alunos de Iniciação Científica, Gustavo Prione, Olívia Domingos e Tânia Mara por todo o apoio durante os trabalhos de laboratório.*
- ✓ *À Professora Maria Perpétua Oliveira, minha orientadora de IC, que me ensinou a dar os primeiros passos para explorar a Química dos Produtos Naturais, a respeitar e valorizar cada dia mais essa fonte de biomoléculas.*
- ✓ *Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva pela imensa colaboração neste trabalho. Aos meus colegas e amigos Fabiana Cardoso, Marina Mesquita e Lucas dos Santos, que disponibilizaram tempo para me ensinar a realizar todos os ensaios farmacológicos propostos neste trabalho.*
- ✓ *À Maria do Socorro F. Melo. Por sua coragem contagiante, muito obrigada. Todo sucesso para Você.*
- ✓ *Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNIFAL-MG, por permitir o desenvolvimento deste trabalho. À Capes pela concessão da Bolsa de Mestrado. Às instituições colaboradoras nas análises de Ressonância Magnética. Muito Obrigada.*
- ✓ *Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho.*



Fotografia de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau

“Quem ouve esquece, quem vê lembra, quem faz aprende”.
(Lao Tzu)

RESUMO

No Brasil, diversas espécies de bignoniaceas têm uso medicinal e algumas atividades bio-farmacológicas foram comprovadas experimentalmente, como as atividades antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana. Metabólitos secundários como naftoquinonas, lignanas, triterpenos e flavonóides foram previamente isolados de espécies desta família. No entanto, a composição química e as atividades biológicas da maior parte delas permanecem desconhecidas. O presente trabalho tem por objetivo o estudo químico e a avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória das raízes, caules, folhas e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda*. Para tal estudo foram obtidos extratos hexânico, clorofórmico, acetato etílico e etanólico das diferentes partes da planta para o estudo fitoquímico, além dos etanólicos brutos para as avaliações farmacológicas. Os compostos isolados foram identificados por comparação com padrões autênticos, temperatura de fusão e técnicas espectroscópicas usuais. A atividade anti-inflamatória foi avaliada no modelo de edema de pata, peritonite induzida por LPS e granuloma comparando os resultados com os grupos controle. Para os ensaios de analgesia foram usados os seguintes modelos animais: contorção abdominal, formalina, “tail-flick” e “hot plate”. Compararam-se os resultados obtidos com os padrões: positivo (morfina) e negativo (CMC). Os resultados apresentados no teste de edema de pata para os extratos e para a substância RABEC-1 demonstraram uma redução do edema das patas dos ratos nos grupos tratados em relação aos grupos controles. No ensaio do granuloma, ocorreu uma redução na formação do tecido granulomatoso nos animais tratados com o extrato etanólico da raiz e também uma redução no número de células leucocitárias no ensaio da Peritonite induzida por LPS. No modelo de analgesia foi observado que os extratos da raiz e da folha apresentaram atividade analgésica periférica, enquanto que o composto RABEC-1, apresentou atividade analgésica central e periférica. Esses resultados indicam que os extratos da raiz e folha e a substância isolada de *A. brachypoda* testados, podem constituir alvo potencial no desenvolvimento de novos medicamentos para o controle farmacológico da dor e de processos inflamatórios. O presente trabalho contribui desta forma, para o conhecimento da química e da atividade farmacológica de *A. brachypoda*.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Bignoniaceae. Dor. Inflamação

ABSTRACT

In Brazil, several species of Bignoniaceae have medicinal and some biological activities have been proven experimentally, such as anti-tumor activity, anti-inflammatory and antimicrobial. Naphthoquinones, lignans, triterpenes and flavonoids were previously isolated from species of this family. However, the chemical composition and biological activities of most of them remain unknown. This paper aims to study the chemical and evaluation of analgesic and anti-inflammatory of roots, stems, leaves and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. For this study were obtained the hexanic, chloroformic, ethylic acetate and ethanolic extracts from different parts of the plant for phytochemical studies, in addition to ethanolic extracts for pharmacological evaluations. The compounds were identified by comparison with authentic standards, melting temperature and the usual spectroscopic techniques. The anti-inflammatory activity was evaluated in the model of paw edema, peritonitis and LPS-induced granuloma by comparing the results with the control groups. For tests of analgesia were used the following animal models: abdominal writhing, formalin, tail-flick "and" hot plate ". We compare the results with the patterns: positive (morphine) and negative (CMC). The results presented in the test paw edema for the extracts and the substance RABEC-1 showed a reduction in paw edema of mice in treated groups compared to control groups. In the granuloma test, there was a reduction in the formation of granulomatous tissue in animals treated with ethanol extract of the root and also a reduction in the number of leukocytes in the trial of peritonitis induced by LPS. In the model of ana was observed that extracts of root and leaf showed peripheral analgesic activity while the compound RABEC-1, showed activity central and peripheral. results indicate that extracts of root and leaf and the substance isolated from *A. brachypoda* tested, may be a potential target for use in therapy of pain and inflammation. This work thus contributes to the knowledge of chemistry and pharmacological activity of *A. brachypoda*.

Keywords: Plant extracts. Bignoniaceae. Pain. Inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| AcOEt- | Acetato de Etila |
| HOAc- | Ácido Acético |
| CCD- | Cromatografia em Camada Delgada |
| CC- | Cromatografia em Colunas de sílica Gel |
| CMC- | Carboximetilcelulose |
| COSY- | Correlated spectroscopy |
| DEPT- | Distortionless enhancement by polarization transfer |
| EEC- | Extrato etanólico do caule |
| EEF- | Extrato etanólico da folha |
| EER- | Extrato etanólico da raiz |
| EtOH- | Etanol |
| Fig- | Figura |
| GABEH- | Substância isolada dos Galhos de <i>Arrabidaea brachypoda</i> |
| HMBC- | “Heteronuclear multiple Bond correlation” |
| HMQC- | “Heteronuclear multiple quantum correlatiao” |
| IV- | Infravermelho |
| LFQM- | Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal |
| LB- | Lieberman-Burchard |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MeOH- | Metanol |
| NOESY- | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| PBS- | Phosfate buffer-saline |

| | |
|--------|---|
| RABEC- | Substância isolada do extrato clorofórmico das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> |
| RMN- | Ressonância Magnética Nuclear |
| SNC- | Sistema Nervoso Central |
| SSE- | Solução Salina Estéril |
| Tf- | Temperatura de fusão |
| TMS- | Tetrametilsilano |
| TTPC- | Triterpeno Pentacíclico |

ÍNDICES DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Exsicata de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau..... | 35 |
| Figura 2- Fotografias de flores (A) e frutos maduros (B) de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau* | 35 |
| Figura 3- Estruturas de flavonóides isolados de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau..... | 36 |
| Figura 4- Fisiopatologia das COXs* | 34 |
| Figura 5- Estrutura molecular da hidrocortisona (cortisol). . | 37 |
| Figura 6- Ativação da cascata de citocinas* | 40 |
| Figura 7- Representação esquemática do processo da dor..... | 42 |
| Figura 8- Fracionamento do extrato clorofórmico das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau..... | 51 |
| Figura 9- Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico do caule de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau..... | 54 |
| Figura 10- Fluxograma do fracionamento das folhas de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau | 56 |
| Figura 11- Esquema da obtenção dos extratos brutos de <i>Arrabidaea brachypoda</i> (DC.) Bureau e avaliação nos modelos de inflamação e dor..... | 57 |
| Figura 12. Espectro no IV para o 3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (KBr, cm-1).... | 65 |
| Figura 13- Espectro de RMN de 1H de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) CDCl ₃ ; 400 MHz)..... | 66 |
| Figura 14- Espectro de RMN de 13C obtido para RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 68 |
| Figura 15- Espectro de DEPT-135 obtido para RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 69 |
| Figura 16- Mapa de contornos HMQC de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 69 |
| Figura 17- Mapa de contornos HMBC de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 70 |
| Figura 18- Mapa de contornos COSY de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno), (CDCl ₃ , 400MHz). | 70 |
| Figura 19- Mapa de contornos NOSEY de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno), (CDCl ₃ , 400 MHz). | 71 |
| Figura 20- Espectro no IV para o ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (KBr, cm-1). | 74 |
| Figura 21- Espectro de RMN de 1H de RABEC-2 (CDCl ₃ , 400MHz)..... | 75 |
| Figura 22- Espectro de RMN de 13C de RABEC-2 (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| Figura 23- Espectro de DEPT 135 de RABEC-2 (ácido 3 β -hidroxilup-20 (29)-en-28-óico) (CDCl ₃ , 400MHz)..... | 76 |
| Figura 24- Mapa de contornos HMQC DE RABEC-2 (ácido betulínico) (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 77 |
| Figura 25- Mapa de contornos COSY de RABEC-2 (ácido betulínico), CDCl ₃ , 400 MHz..... | 77 |
| Figura 26- Mapa de contornos HMBC de Rabec-2 (ácido betulínico), (CDCl ₃ , 400 MHz)..... | 78 |
| Figura 27- Espectro de RABEC-3 (mistura de α -amirina e β -amirina), obtido na região do infravermelho (KBr, cm ⁻¹)..... | 80 |
| Figura 28- Espectro no IV para o RABEC-4 (ácido oleanólico) (KBr, cm ⁻¹)..... | 81 |
| Figura 29- Espectro de RMN de ¹ H de RABEC-4 (ácido oleanólico) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 82 |
| Figura 30- Espectro de RMN de ¹³ C de RABEC-4 (Ácido oleanólico) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 82 |
| Figura 31- Espectro no IV DE RABEC-5 (β -sitosterol) (KBr, cm ⁻¹)..... | 84 |
| Figura 32- Espectro de RMN de ¹ H de RABEC-5 (β -sitosterol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 85 |
| Figura 33- Espectro de RMN de ¹³ C de RABEC-5 (β -sitosterol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 85 |
| Figura 34- Espectro na região do IV para GABEH-2 (Lupeol) (KBr, cm ⁻¹)..... | 87 |
| Figura 35- Espectro de RMN de ¹ H de GABEH-2 (lupeol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 88 |
| Figura 36- Espectro de RMN de ¹³ C de GABEH-2 (lupeol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 88 |
| Figura 37- Espectro na região IV de FABEH-2 (Friedelina) (KBr, cm ⁻¹)..... | 90 |
| Figura 38- Espectro no IV para FABEH-3 (Lupeol) (KBr, cm ⁻¹)..... | 93 |
| Figura 39- Espectro de RMN de ¹ H de FABEH-3 (lupeol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 93 |
| Figura 40- Espectro de RMN de ¹³ C de FABEH-3 (lupeol) (CDCl ₃ ; 500 MHz)..... | 94 |
| Figura 41- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de <i>A. brachypoda</i> no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. **p<0,01 e ***p<0, 001 em relação ao controle foram considerados significativos. | 95 |
| Figura 42- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de <i>A. brachypoda</i> no modelo da formalina. **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos. | 96 |
| Figura 43- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de <i>A. brachypoda</i> no modelo Tail flick. **p<0,01, ***p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos..... | 97 |
| Figura 44- Avaliação do efeito do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de <i>A. brachypoda</i> sobre o comportamento dos animais no modelo do campo aberto (n=8). | 98 |
| Figura 45- Atividade analgésica de extrato RABEC-1, isolada das raízes de <i>A. brachypoda</i> no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. **p<0,01 e ***p<0, 001 em relação ao controle foram considerados significativos. | 99 |
| Figura 46- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de <i>A. brachypoda</i> no teste da formalina. *p<0,05, **p<0,01, ***p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos. | 100 |
| Figura 47- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de <i>A. brachypoda</i> no modelo "Tail flick". *p<0,05, **p<0,01, ***p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos. | 101 |

- Figura 48- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de A. brachypoda no teste da Hot Plate”. *p<0,05, **p<0,01, ***p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos.102**
- Figura 49- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Folhas (EEF) de A. brachypoda no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle foram considerados significativos.103**
- Figura 50- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Folhas (EEF) de A. brachypoda no modelo da Hot plate induzida por ácido acético. *p<0,05 em relação ao controle positivo foram considerados significativos.104**
- Figura 51- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto do Caule (EEC) de A. brachypoda no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. *p<0,05 e **p<0,01 em relação ao controle foram considerados significativos.105**
- Figura 52- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto do Caule (EEC) de A. brachypoda no modelo da placa quente induzida por ácido acético. ***p<0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos.106**
- Figura 53- Atividade anti-inflamatória do extrato Etanólico Bruto das Raízes A. brachypoda (EER) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao controle.....107**

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 28 |
| 4 REVISÃO DE LITERATURA..... | 32 |
| 4.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE..... | 32 |
| 4.1.2 Taxonomia da planta..... | 34 |
| | 35 |
| 4.2 ESTUDOS REALIZADOS COM OUTRAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Arrabidaea</i> | 36 |
| 4.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS..... | 32 |
| 4.4 PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS..... | 44 |
| 4.5 RELAÇÕES ENTRE OS PRINCIPAIS COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> (TRITERPENOS) E A BUSCA DE NOVOS MEDICAMENTOS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA..... | 46 |
| 5 PARTES EXPERIMENTAIS..... | 48 |
| 5.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS..... | 48 |
| 5.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL | 49 |
| 5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 50 |
| 5.4. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS..... | 57 |
| 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 63 |
| 6 RESULTADOS..... | 64 |
| 6.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DAS RAÍZES DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 64 |
| 6.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO CAULE DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 86 |
| 6.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 89 |
| 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ENSAIOS FARMACOLÓGICOS..... | 95 |
| 6.4.1 Avaliação da atividade analgésica do extrato etanólico das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 95 |
| 6.4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DE RABEC-1 ISOLADA DAS RAÍZES DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 99 |
| Teste das contorções abdominais..... | 99 |
| Teste da formalina..... | 100 |
| Teste da “Tail Flick” | 101 |
| | 101 |
| Teste da “Hot Plate”..... | 102 |
| 6.4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 103 |
| 6.4.4 Avaliação da atividade analgésica do extrato etanólico do caule de <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 105 |
| 6.4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das cascas de raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 106 |
| 6.4.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória de RABEC-1 isolada das raízes de <i>Arrabidaea brachypoda</i> | 110 |

| | |
|--|------------|
| 6.4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de Arrabidaea brachypoda..... | 111 |
| | 111 |
| 6.4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de caules de Arrabidaea brachypoda..... | 112 |
| 7 CONCLUSÕES | 113 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 114 |
| CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. Nat. Prod. Rep. v.24, p.465, 2007..... | 116 |

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população. Essa informação é facilmente comprovada pelos inúmeros registros encontrados nas primeiras civilizações que habitaram a terra. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos da natureza, notadamente nas plantas, animais e minerais (CALIXTO & SIQUEIRA, 2008).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Além disso, devido ao elevado custo de muitos medicamentos, a população de muitos países pobres e em desenvolvimento, que não tem acesso à medicina moderna, tem se utilizado dos produtos naturais para o tratamento de suas enfermidades. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 70% da população mundial (estimada em 6 bilhões de pessoas)

não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre à medicina tradicional, especialmente às plantas medicinais, na procura do alívio para muitas doenças (ELISABETSKI, 1987 apud SIMÕES et al, 2003).

Atualmente, é grande o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos. Cerca de 30% dos fármacos disponíveis a terapêutica, são derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, notadamente das plantas. Em algumas doenças como o câncer, os medicamentos derivados de plantas chegam a 60% (NEWMAN et al, 2002 apud BOLDI, 2004).

Os produtos naturais, especialmente as plantas superiores, têm contribuído para a seleção de moléculas líderes ou protótipos para desenho de novos medicamentos, ou mesmo para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados. Várias drogas derivadas de produtos naturais estão, atualmente, em fase de estudos clínicos e deverão chegar ao mercado.

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo em espécies de plantas superiores sendo 20-22% do total existente no planeta. Em função disso e, sobretudo pela grande tradição do uso das plantas medicinais pela medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas, vem sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e, mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (YUNES & CALIXTO, 2001).

Os anti-inflamatórios são um dos melhores exemplos do sucesso do uso de plantas pela indústria farmacêutica brasileira (SILVA; BERNARDO; PARENTE, 2000). O desenvolvimento do anti-inflamatório tópico Acheflan® (Laboratório Aché), produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*, totalmente desenvolvido no Brasil, registrado na ANVISA em 2004 e lançado no mercado em 2005, é um bom exemplo a ser seguido (CALIXTO, 2005a; PASSOS et al, 2007; FERNANDES et al, 2007; MEDEIRO et al, 2007). Desde o seu lançamento em 2005, o produto Acheflan® é o mais prescrito pela classe médica brasileira dentro dos anti-inflamatórios tópicos.

O trabalho de preservação e estudo de espécies vegetais vem se destacando e ganhando importância em vários países (SCHENKEL, 2000). Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que, em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua

utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas.

No segmento acadêmico, a convicção da importância dos recursos naturais para o desenvolvimento de medicamentos vem de longa data. Por sua vez, a interação de indústrias farmacêuticas nacionais com universidades pode resultar em grandes progressos e vantagens para ambas as partes. As universidades possuem químicos, farmacologistas, toxicologistas e médicos que podem conduzir a etapas pré-clínicas e clínicas necessárias para a validação de produtos vegetais usados pela população, assim como para o desenvolvimento de novos medicamentos fitoterápicos (MIRANDA, 2007).

É dentro desse contexto que o Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Unifal-MG vem contribuindo não somente para a fitoquímica clássica (isolamento e determinação estrutural), mas também realizando trabalhos que envolvem atividade biológica de plantas e compostos isolados das mesmas que apresentem algum tipo de uso na medicina tradicional.

2 JUSTIFICATIVA

A necessidade de novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade, tem intensificado os estudos para a descoberta de novos fármacos. O interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividades analgésicas utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória) vem aumentando significativamente. Pode-se afirmar também que ainda não dispomos do fármaco anti-inflamatório ideal, com efeitos mínimos indesejáveis e que seja realmente eficaz nos transtornos inflamatórios.

A busca de novos medicamentos em plantas tropicais é, hoje, a esperança mais concreta para os pacientes de doenças crônicas como doenças cardiovasculares e diabetes e também para os que possuem doenças graves, como o câncer e a Aids. Ao contrário dos enormes investimentos, dos altos riscos e longo tempo de desenvolvimento de uma droga inovadora (nova entidade química), que está restrito a algumas indústrias sediadas em poucos países desenvolvidos, o desenvolvimento de um fitomedicamento com comprovação científica de segurança, eficácia e qualidade

demanda muito menos recursos e conseqüentemente menores riscos (CALIXTO, 2000).

Dentre as várias plantas empregadas na medicina tradicional brasileira, as pertencentes à família Bignoniaceae são utilizadas na cura de várias enfermidades. A espécie *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau é largamente empregada com finalidades terapêuticas pela população da região noroeste do estado de Minas Gerais, principalmente contra cálculos renais. Porém verificou-se uma escassez de informação de estudos relacionados à essa espécie, tanto no âmbito químico como no farmacológico.

Com base nos relatos dos efeitos farmacológicos associados à família Bignoniaceae e dos compostos isolados em espécies do gênero *Arrabidaea* acredita-se que o estudo dos constituintes químicos e as propriedades farmacológicas de *Arrabidaea brachypoda* poderão fornecer resultados importantes para a produção de fitoterápico ou mesmo para a descoberta de novas moléculas que poderão vir a ser usadas como protótipos de fármacos ou como matéria-prima para a síntese de diferentes substâncias anti-inflamatórias e analgésicas. Não há na literatura especializada informações que evidenciem a avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de extrato e/ou compostos isolados obtidos de *Arrabidaea brachypoda*.

3 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho consistiu na realização do estudo fitoquímico das folhas, caule e raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau, de modo a contribuir para o estudo quimiotaxonômico da mesma e de ensaios farmacológicos em modelos de dor e inflamação. Os experimentos químicos utilizados neste trabalho envolveram:

- ◆ Obter extratos hexânico, clorofórmico, acetato etílico e etanólico por processo de extração contínua em aparelho Soxhlet;
- ◆ Fracionar os extratos por meio de processos cromatográficos;
- ◆ Isolar os constituintes químicos através de diferentes processos cromatográficos;
- ◆ Elucidar os compostos isolados com auxílio de métodos espectrométricos de análise;

- ◆ Obtenção de extratos brutos e substâncias puras em quantidades suficientes para realização de ensaios farmacológicos;
- ◆ Contribuir para o conhecimento sobre o gênero *Arrabidaea*.

-Realizar ensaios farmacológicos utilizando extratos brutos e também substância purificadas para investigar o potencial de atividade anti-inflamatória e analgésica.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA BIGNONIACEAE

A família Bignoniaceae compreende 120 gêneros e 800 espécies, de ampla distribuição nas regiões tropicais de todo o mundo, especialmente frequente nos trópicos americanos. São plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas e também trepadeiras, com gavinhas foliares, às vezes modificadas em fixadores com unhas (*Bignonia*). Folhas compostas raramente simples (*Crescentia*), de disposição oposta. Flores granevistosias, diclamídeas, hermafrodita pentâmeras, desimetriazigomorfa. Corola ligeiramente bilabiada. Androceu formado por 4 estames didínamos e 1 estaminódio, às vezes muito desenvolvido e glandular (*Jacarandá*). Uma teça de cada um dos estames férteis. Às vezes não desenvolvida (*Jacarandá*). Ovário sempre súpero, bicarpelar, bilocular com 2 lóculos e muitos óvulos. Placenta sempre bipartida. Fruto capsular seco, loculicida ou septicida, às vezes cápsula septífrega, sempre com sementes aladas; raramente indeiscente com sementes não aladas (*Crescentia*). (JOLY, 1998).

Exemplos comuns desta família: *Tabebuia*; o ipê e também o pau-d'arco do nordeste, com flores amarelas, roxas ou brancas; *Jacarandá*, a caroba, carobinha do campo, também o jacarandá-mimoso; *Pyrostegia*, a conhecida flor-de-são-joão com flores cor de abóbora, trepadeira comum no interior; *Anemopaegma*, trepadeira da mata com flores brancas; *Pithecoctenium*, o conhecido pente de macaco das matas, com flores amarelas; *Bignonia*, a popular unha de gato, trepadeira das matas; *Crescentia*, o útil cuietê ou cabaça-de-árvore, com seus enormes frutos dos quais se fazem as cuias. *Tecoma (Stenelobium)*, com flores verde-amareladas; *Arrabidaea* e *Zeyhera* nos cerrados, estes com frutos que se separam em duas metades, como se fossem pequenas canoas, com papilas

4.1.1 Características do gênero *Arrabidaea*

O gênero *Arrabidaea* é o maior da tribo Bignonieae, com aproximadamente 170 espécies. Sua taxonomia é complexa, pois muitas características diagnósticas de *Arrabidaea* são compartilhadas com espécies de outros gêneros (JOLY, 1998).

Subarbusto, arbusto e até árvore ereta e raramente com ramos escandentes; ramos florais com 35 a 50 cm, os mais novos meio achatados, folhas com pecíolos de 5-10 e mais raramente de 12 mm e lâmina simples, glabra, polimorfa; raramente ternadas, mais freqüentemente opostas cruzadas; inflorescência paniculada terminalis em ramos axilares; flores com cálice tubuloso pequeno encimado por 5 dentes, corola campanulada, rosa-vilácea, com 5 pétalas; fruto cápsula de 15-20 cm de comprimento por 12-14 mm de largura sementes aladas (FERRI, apud TOPPA, 1969). Ocorre em fisionomias campestres de cerrado, em cerrado típico e nas bordas do cerradão. O gênero mais próximo morfologicamente é *Cuspidaria*, que se diferencia de *Arrabidaea* pelos lacínios do cálice, mais alongados. No entanto, são encontradas espécies de *Arrabidaea* que possuem cálice muito semelhante ao de *Cuspidaria*.

Descrição Botânica de *Arrabidaea brachypoda*

Segundo Queiroz e Silva (2003) *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau (fig.1), possui arbustos escandentes de até 70 cm, ramos cilíndricos, estriados glabros, com lentículas. Pseudo-estípulas ausentes. Folhas 1-2-folioladas; folíolos de 8-10 x 4-5 cm, oblongos a obovados, coníáceos, concolores, ápice acuminado e arredondado, algumas vezes mucronulado, margem inteira, plana, base

cuneada, nervação palminérvia, faces adaxial e abaxial glabras; pecíolos 1,5-2 cm; gavinhas simples. Inflorescência em tirso e eixo da inflorescência glabro. Epicálice ausente; cálice dentado, glabro, corola rósea a roxa, com faixas brancas inteiramente; infundibuliforme, densamente tomentosa; estames inclusos, antenas glabras, estaminódio reduzido, glabro; disco nectarífero conspícuo. Cápsula septífraga 21-25 x 1,5-2, coriácea, glabra, cálice persistente. Sementes ala membranáceas. Caracteriza-se pelas folhas simples ou 2 foliolados com nervação palminérvia grossas no exterior. (JOLY, 1998).

4.1.2 Taxonomia da planta

| | |
|---------------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| Superdivisão | Spermatophyta |
| Divisão | Magnoliopsida |
| Subclasse | Asteridae |
| Ordem | Scrophulariales |
| Família | Bignoniaceae |
| Gênero | <i>Arrabidaea</i> |

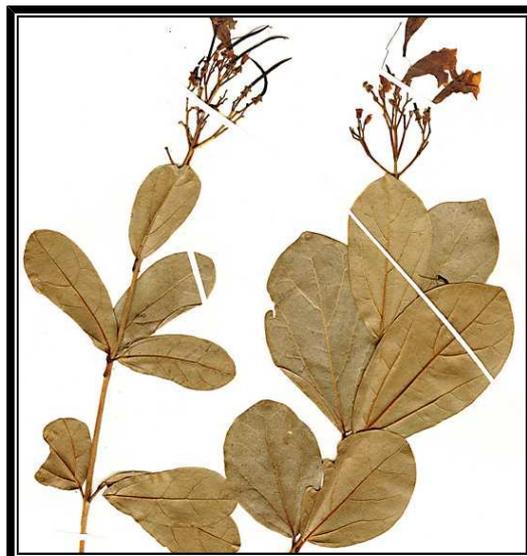


Figura 1- Exsicata de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau

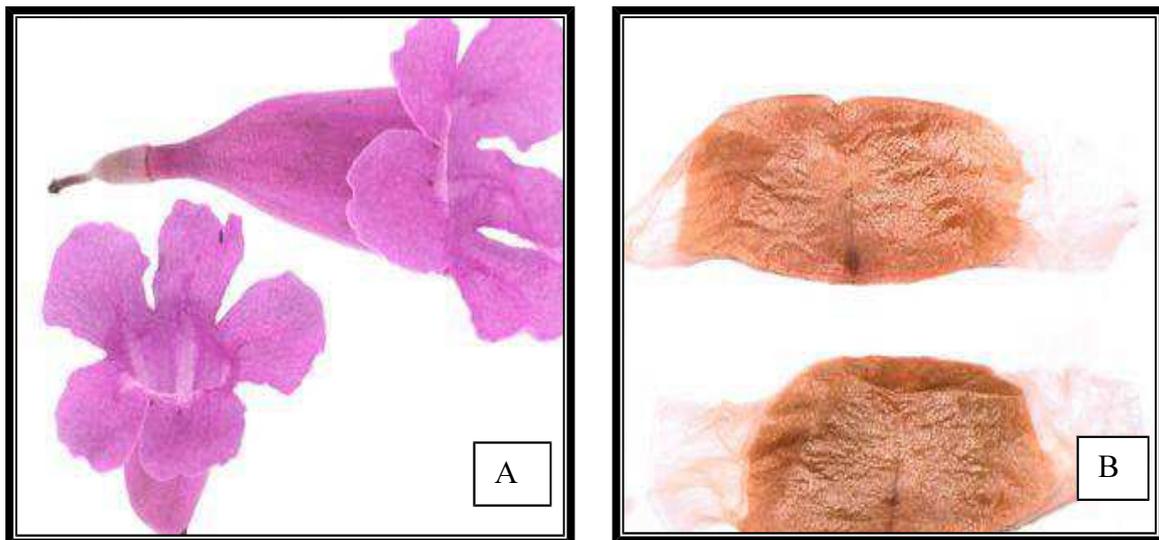


Figura 2- Fotografias de flores (A) e frutos maduros (B) de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau .

*Fonte: [HTTP://WWW.FAPEPI.PI.GOV.BR/CARRASCO/](http://www.fapepi.pi.gov.br/carrasco/)

Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau é conhecida como “Cervejinha do Campo”, o nome é atribuído em virtude da grande quantidade de espuma (provável presença de saponinas), (MATOS, 2008), formada quando suas cascas passam pelo processo de maceração em água (processo de consumo da planta mais usado). O fim terapêutico mais comum é contra cálculos renais. A propriedade diurética pode ser atribuída à possível presença de saponinas triterpênicas na planta.

Em estudos realizados com *Arrabidaea brachypoda* , Alcerito e colaboradores (2002), relataram estudos sobre atividade antifúngica de *A. brachypoda* contra *Cladosporium sphaerospermum*. O crescimento epicuticular das folhas de *Arrabidaea brachypoda* foi analisado visando o acúmulo de flavonóides e 4 compostos foram isolados. Eles foram identificados como 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**3**), cirsioliol (**4**), cirsimaritina (**5**) e hispidulina (**6**). Dois atributos principais resultantes desse trabalho foram o relato do composto 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (**3**) como um

produto natural e também a primeira vez que o cirsiolol (**4**) é encontrado em Bignoniaceae.

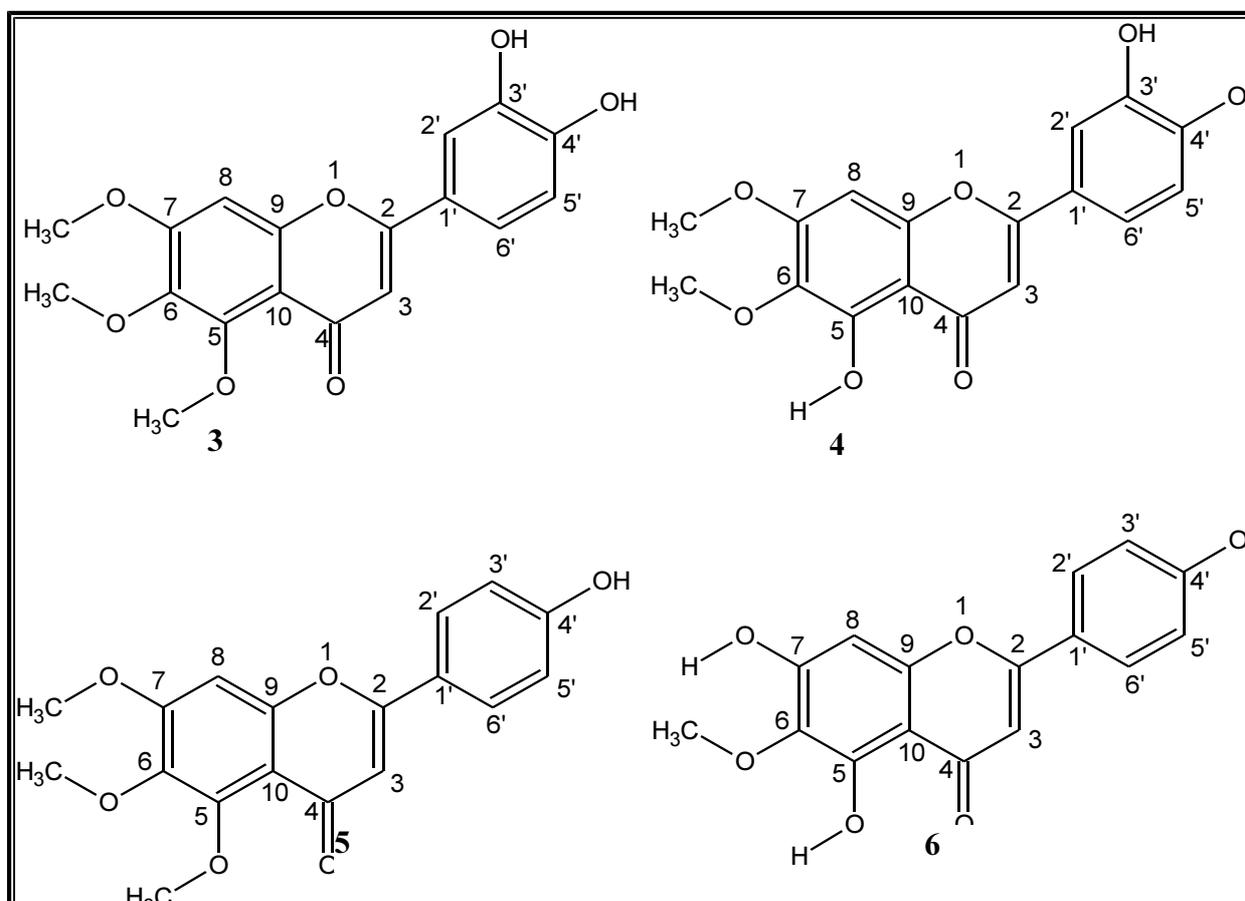


Figura 3- Estruturas de flavonóides isolados de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau.

ERO

Arrabidaea

Poucos são os dados disponíveis na literatura sobre a quimiotaxonomia e atividades biológicas atribuídas ao gênero *Arrabidaea*. Atualmente cerca de 6 espécies vem sendo estudadas e relatadas como fontes ricas em derivados fenólicos, triterpenos, descritos como substâncias responsáveis pela atividade atribuída na medicina tradicional para algumas dessas espécies com atividade antifúngica, anti-inflamatória e cicatrizante. O quadro 1 reúne dados químicos e bio-farmacológicos descritos na literatura para espécies do gênero *Arrabidaea*. Estudos de validação dos dados etnofarmacológicos confirmaram inúmeras indicações populares para diversas espécies desse gênero, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antiprotozoário e antioxidante (BOLZANI et al, 2003; ALCERITO et al, 2002; LEITE et al, 2006 e ZORN et al, 2001).

As espécies desse gênero são detentoras de compostos que apresentam uma diversidade de atividades em vários alvos biológicos, o que torna ainda mais importante o estudo com *Arrabidaea brachypoda*.

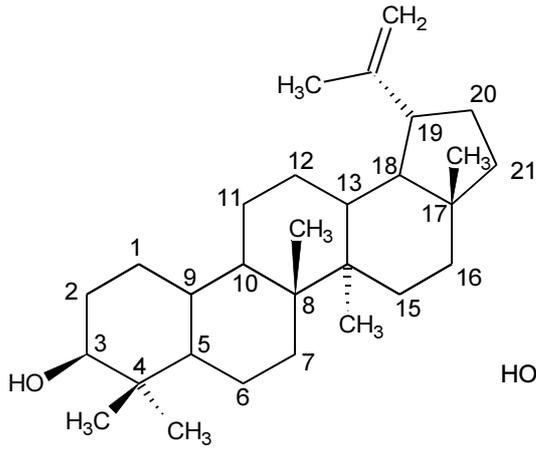
É um gênero bem diversificado em relação ao número de espécies, porém pouco conhecido pela comunidade científica da Química de Produtos Naturais comparado com a importância que o mesmo apresenta e com o pequeno número de espécies investigadas cientificamente.

Nos ecossistemas brasileiros, particularmente nos cerrados, o gênero *Arrabidaea* é muito freqüente, sendo que na região sudeste algumas espécies são bastante usadas na medicina tradicional (BOLZANI,2003).

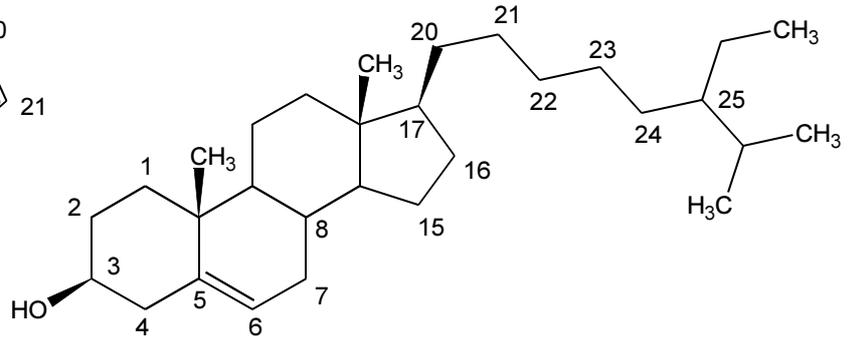
A valorização deste gênero torna-se urgente, uma vez que o bioma onde elas são freqüentemente encontradas (o Cerrado) encontra-se em processo de fragmentação e o risco dessas espécies serem extintas sem terem suas propriedades químico-farmacológicas conhecidas é muito grande.

Quadro 1- Propriedades bio-farmacológicas e compostos isolados de espécies do Gênero *Arrabidaea*

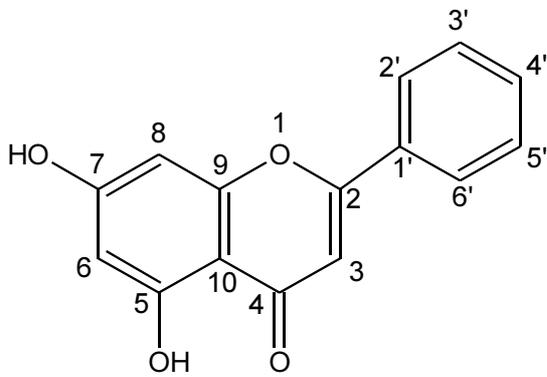
| Espécies de <i>Arrabidaea</i> | Propriedades Bio-farmacológicas | Compostos isolados | Ref. |
|-------------------------------|---|--|--|
| <i>A. samydoides</i> | Atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, possui atividade inibitória do crescimento de linhagens mutantes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Lupeol (1), sitosterol (2), crisina (3), estigmasterol (4) 3 β , 16 α -diidroxi-olean-12-eno (5), Eritrodiol (5b), uvaol(5a), Ácido ursólico (5b), (2'- <i>O-trans</i> -caffeoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona (7a), 2-(2'- <i>O-trans</i> -cinamoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona (7b), 2-(2'- <i>O-trans</i> coumaroil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona(7c), mangiferina (7d), 2-(2'- <i>O-benzoil</i>)-C- β -Dglucopiranosil-1,3,6,7-tetraidroxixantona (7e), emuraxantona (7f) | Bolzani et al, 2003 Bolzani et al, 2006 |
| <i>A. triplinervia</i> | Atividade contra formas tripomastigota de <i>Tripanossoma cruzi</i> | Ácido ursólico (15), ácido oleanólico (15a), ácido pomólico, alpinetina (14), Eritrodiol (13a), Acetato oleanólico (13b) | Leite et al, 2006 |
| <i>A. bilabiata</i> | Alta toxicidade | Ácido monofluoracético, esteróides cardioativos | Tokarnia et al, 2004 |
| <i>A. chica</i> | Anti-inflamatória, adstringente, combate à leucemia e cicatrizante | 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi- flavona (8), 6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi- flavilium (9), 6, 6, 7, 4'-trihidroxi-5-metoxi-flavilum (10), 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-favilium(11) 6,7-dihidroxi-5,4-dimetoxi-favilium (12) | Takemura et al, 1995 Zorn et al, 2001 |
| <i>A. patellifera</i> | Antioxidante | Mangiferina(16), isomangiferina (16a), 3'-O-hidroxi benzoilmangiferina (16b), 3'-O- <i>trans</i> -coumaroilmangiferina (16c), 6'-O- <i>trans</i> -coumaroilmangiferina (16d), 3'-O- <i>trans</i> -cinnamoilmangiferina ^{16e} , 3'-O- <i>trans</i> -caffeoilmangiferina (16e) 3'-O-benzoilmangiferina (16f) | Martin et al, 2008 |
| <i>A. brachypoda</i> | Antimicrobiano | 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (17), cirsiliol (18), cirsimaritina (19) e hispidulina (20). 3,4-dihidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona (21) cirsiliol (22) | Alcerito et al, 2002 |



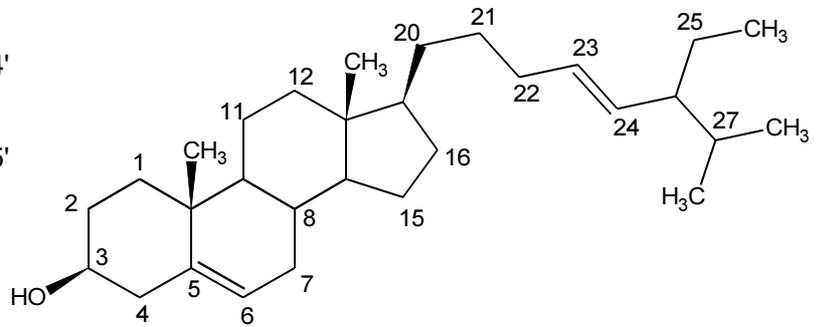
1



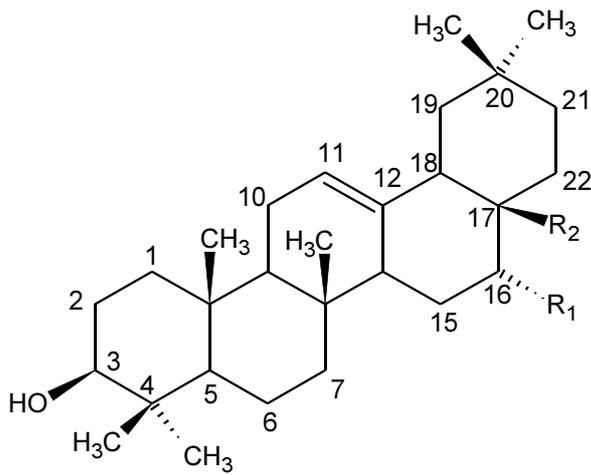
2



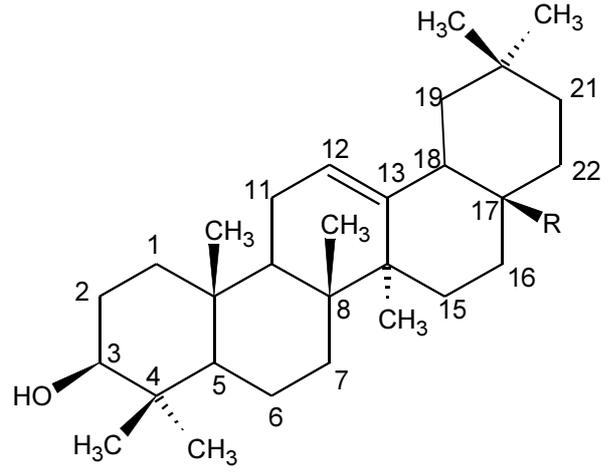
3



4



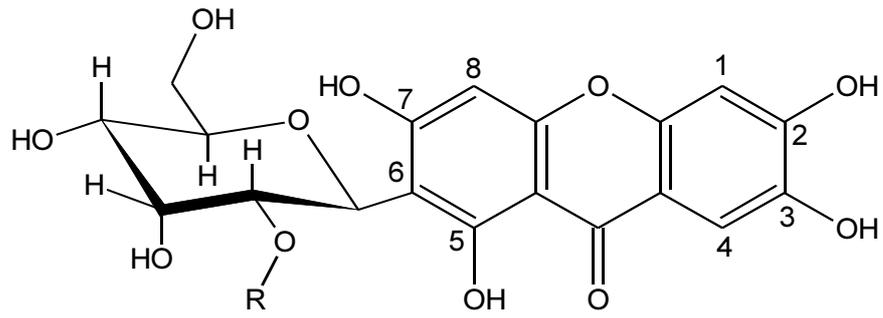
5



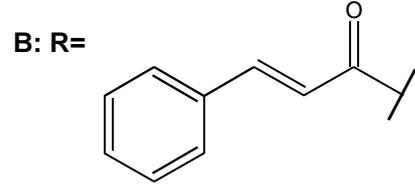
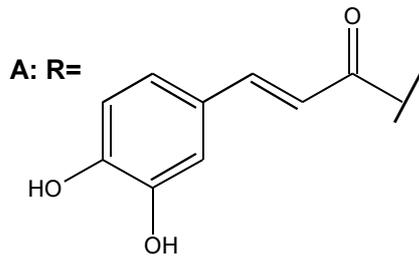
6

A $R_1=OH$ $R_2=CH_3$
 B $R_1=H$ $R_2=CH_2OH$

A $R=CH_2OH$
 B $R=COOH$

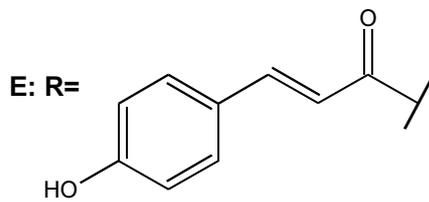
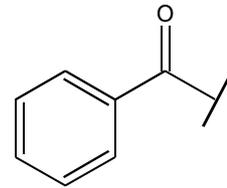


7

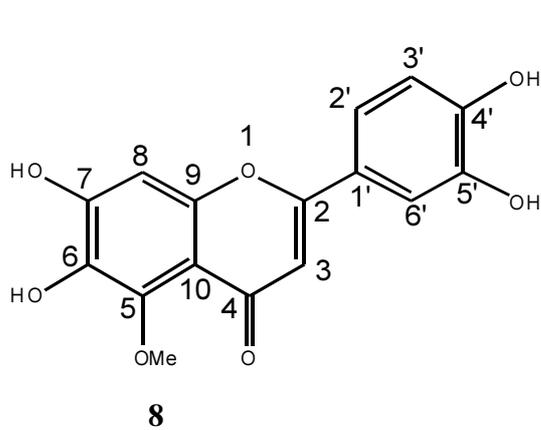
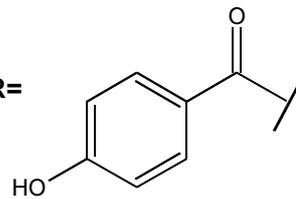


C: R=H

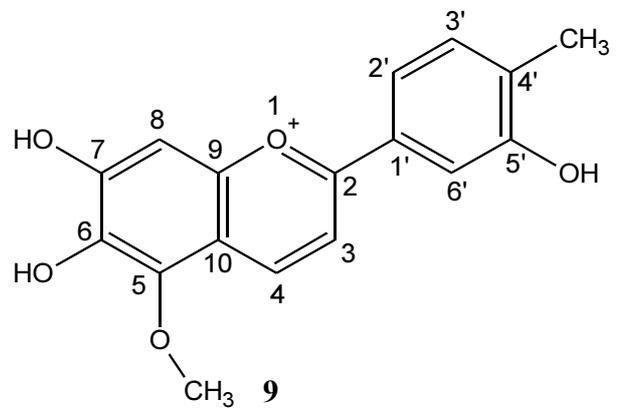
D: R=



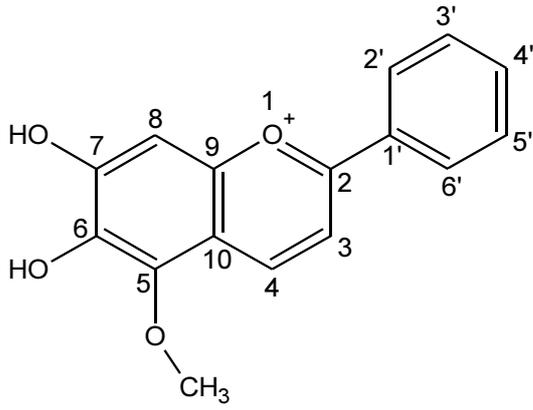
F: R=



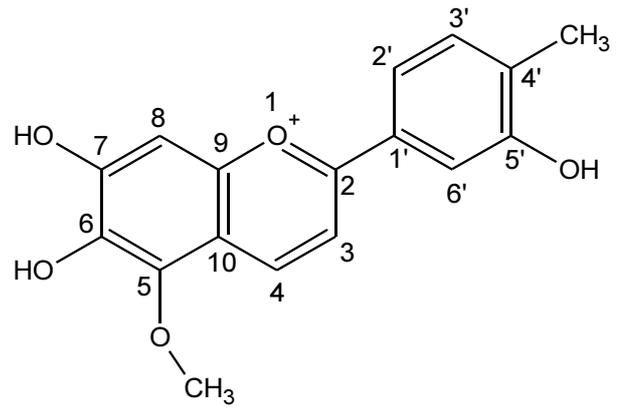
8



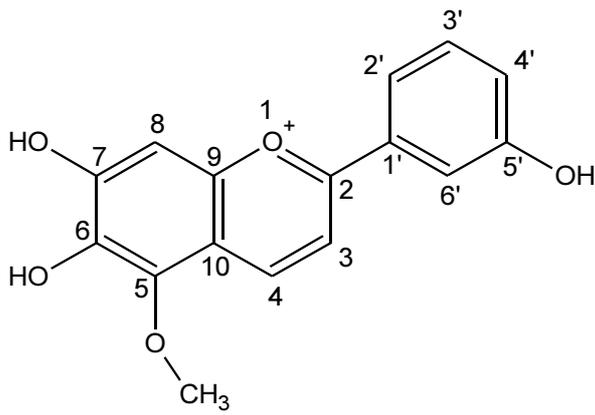
9



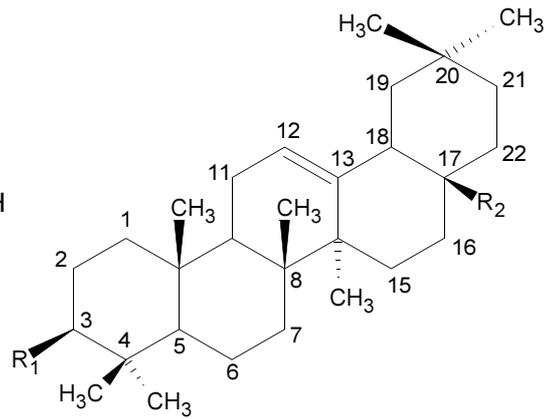
10



11



12



13

| R ₁ | R ₂ |
|------------------------|--------------------|
| A. OH | COOH |
| ~ F OCOCH ₃ | COOH |
| C. OCOCH ₃ | CHO |
| ~ H OH | CH ₂ OH |

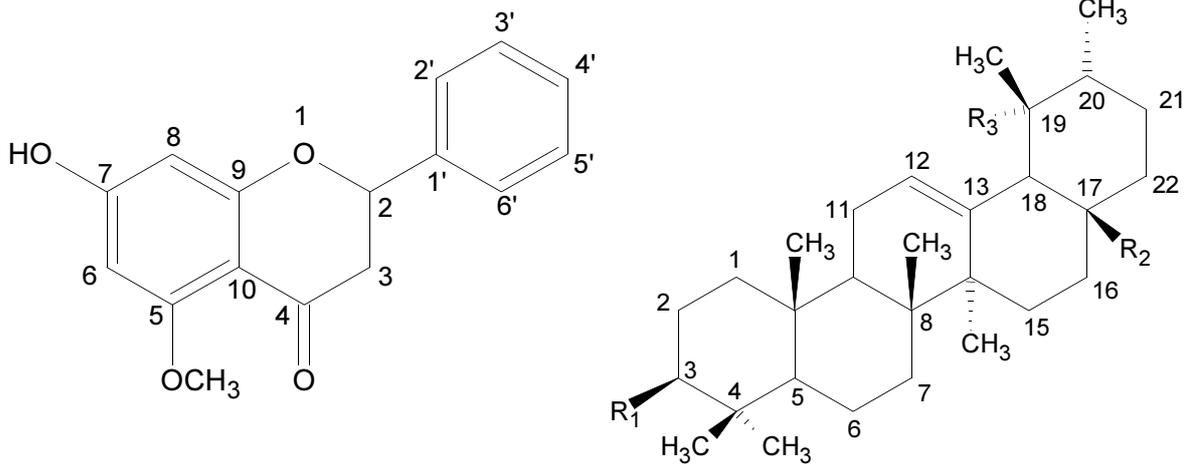
B

C.

~

D.

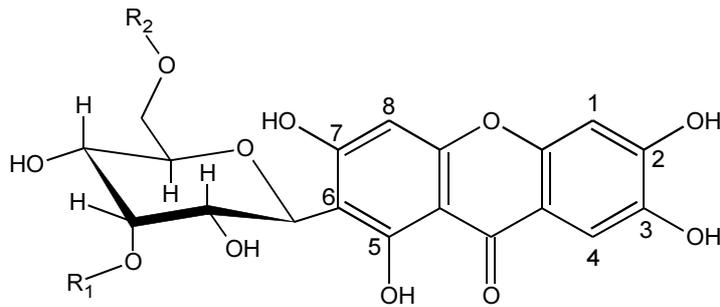
~



14

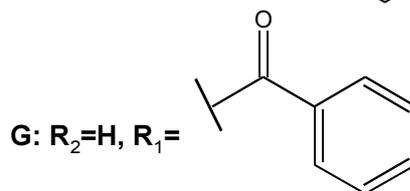
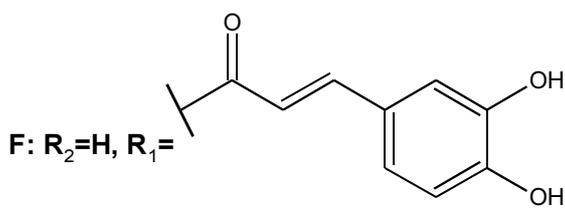
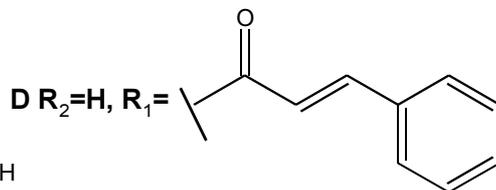
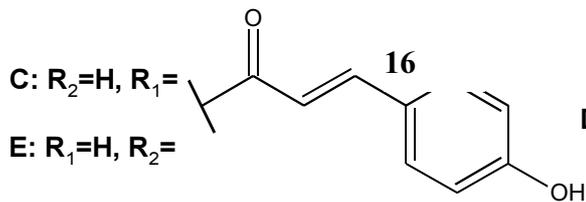
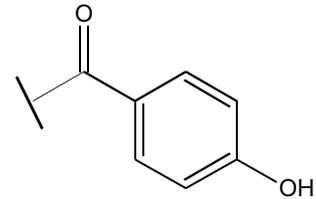
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-----------|--------------------|--------------------|----------------|
| A | OH | COOH | H |
| B | OCOCH ₃ | COOH | H |
| C | OH | COOCH ₃ | H |
| E4 | OCOCH ₃ | COOCH ₃ | H |
| I | OH | COOH | OH |

15



A: R₁, R₂=H

B: R₂=H, R₁=



4.3 ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Os medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos constituem um grupo heterogêneo de compostos que, em muitos casos, não estão relacionados quimicamente (embora a maioria deles seja de ácidos orgânicos), porém compartilham de algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo é a aspirina que foi introduzida na medicina em 1899 por Dreser. O nome aspirina parece ter sido derivado da *Spiraea*, espécie de planta a partir da qual o ácido salicílico foi preparado durante algum tempo (GOODMAN & GILMAN, 2007).

Pouco tempo depois, os salicilatos sintéticos substituíram os compostos mais dispendiosos obtidos das fontes naturais. Nos primeiros anos do século XIX, os principais benefícios terapêuticos da aspirina estavam demonstrados (GOODMAN & GILMAN, 2007)

Embora existam evidências seguras de que as doses terapêuticas da aspirina reduzam a biossíntese das prostaglandinas nos seres humanos e haja uma correlação razoavelmente direta entre a potência desse medicamento como inibidor da ciclooxigenase e sua atividade anti-inflamatória, a indometacina é uma exceção notável porque ela é mais potente nos testes anti-inflamatórios do que no ensaio de inibição enzimática. No entanto, muitos estudos indicam que a inibição da síntese das prostaglandinas é o mecanismo principal das ações terapêuticas dos medicamentos anti-inflamatórios (GOODMAN & GILMAN, 2007).

4.3.1 Processo inflamatório

Inflamação é a reação dos tecidos vascularizados à lesão local. Apesar dos efeitos da inflamação serem, muitas vezes, observados como indesejáveis, pois causam desconforto e são desagradáveis, mostram-se em essência benéficos, permitindo ao indivíduo sobreviver com os efeitos do estresse de cada dia. Sem as respostas inflamatórias, feridas não causariam e infecções menores poderiam sobrepujar. No entanto, a inflamação também produz efeitos indesejáveis. Por exemplo, os efeitos incapacitantes da artrite reumatóide são resultados da inflamação (ROCHA, 2006).

O processo inflamatório envolve uma sucessão de ativações enzimáticas, liberação de mediadores, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação (VANE; BOTTING, 1996). No processo de inflamação, células imunologicamente competentes são acionadas e agem no sentido de inativar ou destruir microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e proteínas antigênicas, além de iniciar a reparação tecidual. Esse processo possui quatro sinais característicos, descritos há mais de 2000 anos por Celsus: rubor, calor, edema e dor. Quando o processo reparatório se completa, naturalmente o processo inflamatório e seus sinais desaparecem (GOODMAN & GILMAN, 2007).

Muito embora este mecanismo de defesa seja geralmente benéfico, efeitos maléficos indesejáveis são comuns. Estes são ocasionados por uma resposta excessiva que pode causar lesão tecidual progressiva, como por exemplo, no caso das artrites, onde o processo inflamatório leva à destruição do osso e da cartilagem, comprometendo a função articular. Em tais casos, fármacos anti-inflamatórios ou imunossupressivos podem ser necessários para modular o processo anti-inflamatório (VANE; BOTTING, 1995).

O processo inflamatório caracteriza-se pela sua complexidade e dinamismo, sendo multimediado com a participação de eventos celulares e humorais interdependentes, podendo manifestar-se de forma diversa tanto no tocante à duração quanto na intensidade da resposta inflamatória, que por sua vez depende do tipo de injúria ou estímulo nocivo. Basicamente, a reação inflamatória aguda caracteriza-se por dilatação arteriolar, aumento de permeabilidade vascular, acúmulo de leucócitos e dor. Os leucócitos são atraídos ao local da lesão por mediadores inflamatórios com atividade quimiotática, denominados mediadores químicos. Os mediadores químicos específicos variam de acordo com o tipo de processo inflamatório. Eles podem ser aminas, como a histamina e a 5-

hidroxitriptamina; lipídios, como as prostaglandinas; pequenos peptídeos, como a bradicinina, e peptídeos maiores, como a interleucina (ZANINI & OGA, 1994).

A descoberta dessa ampla variedade de mediadores químicos veio esclarecer um aparente paradoxo, onde um fármaco anti-inflamatório ao interferir na ação de um mediador particularmente importante em um tipo de inflamação, não afeta processos inflamatórios independentes do mediador alvo. A inflamação é desencadeada pela liberação dos mediadores químicos originados nos tecidos lesados e nas células migratórias, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A2 e liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos, PAF-acéter (fator ativador de plaquetas) e enzimas lisossômicas.

Essas enzimas têm potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. O metabolismo do ácido araquidônico (Fig. 4) dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas como prostaglandinas (PGs), tromboxanas (TXs), ácido hidroxicicosatetraenóicos (HETEs) e hidroperoxieicosatetraenóicos (HPETEs), leucotrienos (LTs), lipoxinas (LXs) e ácidos epoxieicosatetraenóicos (EETs), que tem importante papel na fisiopatologia da inflamação (GOOLDMAN & GILMAN, 1996).

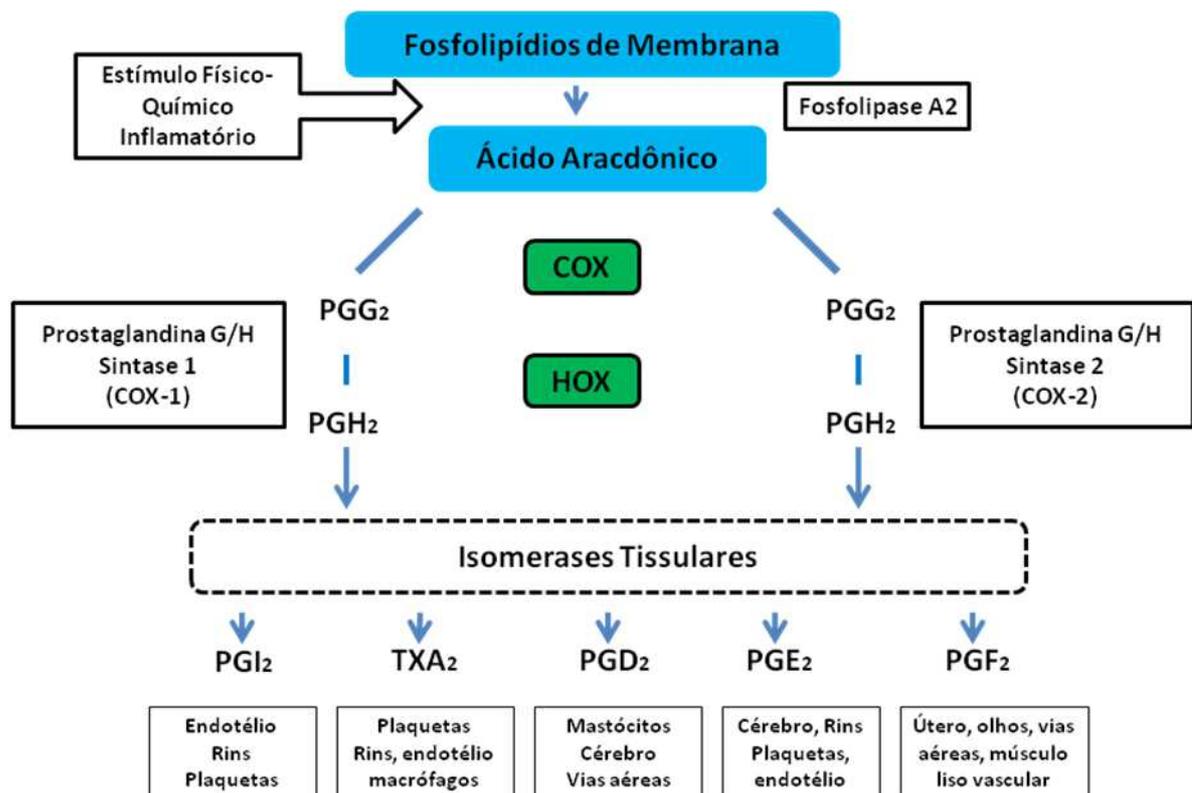


Figura 4- Fisiopatologia das COXs*

*Fonte: Kummer e col. (2002)

A ação anti-inflamatória de muitos fármacos acontece pela inibição da síntese das PGs, que são ácidos graxos insaturados contendo 20 átomos de carbono e uma estrutura cíclica incorporada. O entendimento da biossíntese desta substância é fundamental para a compreensão da ação desses fármacos anti-inflamatórios. As PGs e os compostos correlatos são produzidos em quantidades ínfimas em todos os tecidos. Em geral agem diretamente nos tecidos onde são sintetizados, sendo rapidamente metabolizados a produtos inativos em seus sítios de ação. Assim, as PGs não circulam no sangue em concentrações significativas. As PGs são sintetizadas a partir de um precursor primário, o ácido araquidônico. Este ácido é liberado dos fosfolídeos das membranas celulares pela ação da fosfolipase A2, através de um processo controlado por hormônios e outros estímulos (GOOLDMAN & GILMAN, 2007).

A migração de leucócitos para a área inflamada é um aspecto importante do processo inflamatório. No entanto é pouco provável que PGs sejam os principais envolvidos na resposta quimiotática, pois outro produto do metabolismo do ácido araquidônico, o leucotrieno B4, é uma substância quimiotática muito potente. Outra evidência desse fato é que a enzima lipoxigenase, que gera os leucotrienos, é insensível às drogas tipo aspirina; portanto, concentrações dessas drogas que suprimem a formação de PGs em geral não diminuem a migração celular (Higgs *et al.*, 1980). A ausência da migração celular costuma ser observada com a presença de maiores concentrações de PGs, mas a inibição da lipoxigenase não parece estar envolvida. Entretanto, as drogas que inibem a lipoxigenase e a cicloxigenase possuem ações antiinflamatórias superiores (GOOLDMAN & GILMAN, 2007).

As PGs estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha lesão ou inflamação. Estudos envolvendo a mensuração eletrofisiológica da descarga nervosa sensorial na presença de PGs indicaram que quando as PGs foram administradas, os receptores da dor se tornaram mais sensíveis a estímulos químicos ou mecânicos (GOOLDMAN & GILMAN, 2007).

Segundo Sousa e colaboradores (2003), o objetivo de conhecer melhor a inflamação iniciou as tentativas de reproduzir o fenômeno experimental. Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas no fenômeno, logo a utilização de modelos experimentais, a

aplicação de culturas de células para reproduzir *in vitro* alguns fenômenos inflamatórios e a utilização de técnicas de biologia molecular permitiu caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas que dele participam.

4.3.2 Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios estão entre os fármacos mais empregados na medicina atual. Mais de 30 milhões de pessoas no mundo tomam todos os dias, algum tipo de antiinflamatório, sendo 40% delas com mais de 60 anos (10-25% das pessoas com mais de 60 anos usam ou usaram recentemente um antiinflamatório) (CALIXTO, 2000).

A utilização cada vez mais freqüente e indiscriminada de anti-inflamatórios não esteroidais tem aumentado significativamente os riscos de hemorragias gastrintestinais e úlceras pépticas na população mundial (AKARCA, 2005). Apesar dos recentes avanços nas pesquisas de novos anti-inflamatórios, inibidores específicos da enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) (que teoricamente diminuiriam os riscos de lesões ulcerosas tão comuns nos demais anti-inflamatórios) possuem efeitos adversos: provocam redução no processo de cicatrização da mucosa péptica e inibição dos fatores angiogênicos e de crescimento de fibroblastos, o que agravaria os danos à mucosa gastroduodenal (SANCHEZ-FIDALGO et al, 2004).

Anti-inflamatórios esteroidais-corticosteróides

Os corticosteróides são substâncias endógenas que estão quimicamente classificadas como esteróides; e são originalmente identificados no córtex da glândula adrenal. A glândula adrenal na verdade consiste em duas pequenas glândulas dispostas acima dos rins. A porção externa da glândula adrenal, o córtex adrenal, é essencial para a vida. Sua origem embriológica é completamente diferente daquela da medula adrenal. O córtex adrenal produz vários hormônios

potentes, todos derivados esteróides produzindo o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno característico.

Estes hormônios esteróides são agrupados em 3 classes gerais, cada uma com funções características:

- Os glicocorticóides, que atuam primariamente no metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídios;
- Os mineralocorticóides, que atuam primariamente no transporte de eletrólitos e na distribuição de água nos tecidos;
- Os andrógenos ou estrógenos, que atuam primariamente sobre as características sexuais secundárias em seus órgãos alvos específicos.

No ser humano, o principal glicocorticóide é o cortisol (ou hidrocortisona) (fig. 5), enquanto o mineralocorticóide mais importante é a aldosterona.

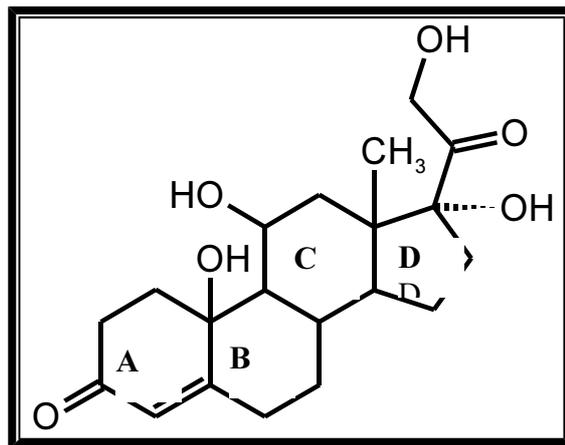


Figura 5- Estrutura molecular da hidrocortisona (cortisol)

Os glicocorticóides têm a capacidade de modificar o processo inflamatório dos tecidos que, ao serem agredidos apresentam um extravasamento de fluidos intracelulares para o espaço peri-tecidual; em seguida a área é invadida por leucócitos e se inicia o processo de cicatrização com a formação de coágulo. As doses farmacológicas de cortisol e seus análogos têm a propriedade de limitar esse processo, sendo que esses efeitos levam a encobrir processos infecciosos em pacientes que usam essas substâncias por longo tempo. No entanto a vantagem desse mesmo mecanismo no tratamento de artrite reumatóide, como foi demonstrado por Henchi e Kendal em 1949 (ZANINI, 1994).

Em termos clínicos, a administração de corticosteróides pelos seus efeitos antiinflamatórios é uma terapia paliativa, pois a causa subjacente da doença

permanece e as manifestações antiinflamatórias são meramente suprimidas. Essa supressão da inflamação e suas conseqüências tornaram os corticosteróides agentes terapêuticos valiosos e, de fato, às vezes salvadores. Porém, é também esta propriedade que lhes dá um potencial quase único de desastre terapêutico. Os sinais e sintomas da inflamação são expressões do processo patológico que indica o diagnóstico e permite uma avaliação da eficácia do tratamento. Eles podem estar ausentes em pacientes tratados com glicocorticóides (GOOLDMAN & GILMAN, 2007).

Os glicocorticóides são utilizados também no tratamento dos sintomas das reações alérgicas a fármacos, soro e transfusões, da asma brônquica e da rinite alérgica. Entretanto, estes fármacos não são curativos. Um exemplo é o uso do dipropionato de beclometasona e a triancinolona, que são aplicados topicamente na mucosa do trato respiratório superior por inalação, reduzindo os efeitos sistêmicos da doença (HARVEY, 2000).

A química dos glicocorticóides

Todos os hormônios esteróideais têm um anel ciclopentanoperidrofenantreno como seu núcleo químico. e seu sistema convencional de numeração estão ilustrados na estrutura do cortisol ou hidrocortisona como mostra na Fig. 5. A maioria dos esteróides naturais contém cadeias laterais alcoólicas e, por esta razão, são indicados como esteróis. É possível ainda uma grande variedade de formas isoméricas dos esteróides: a união dos anéis A e B pode ter uma configuração *trans* ou *cis*. Já os estrogênios não apresentam esta forma de isomeria porque seu anel A é aromático. Hidrogênios ou outros grupos podem estar ligados aos anéis com uma orientação acima (β -) ou abaixo (α -) do plano do anel.

Cerca de 50 esteróides cristalinos foram isolados da adrenal, mas apenas oito, ao que se sabe, possuem atividade fisiológica. Os mais importantes são: cortisona, hidrocortisona (cortisol, 17-hidroxicorticosterona), aldosterona, e os dois androgênios, androstenediona (androst-4-ene-3,17-diona) e desidroepiandrosterona. O cortisol é o principal hormônio adrenocortical livre circulante no plasma humano. O nível normal de cortisol no plasma é de 12 $\mu\text{g/dL}$. Os demais hormônios esteróides

encontram-se no plasma humano em concentrações relativamente pequenas (HARPER et al, 1982).

Estruturalmente, glicocorticóides apresentam grupos polares, hidroxilas ou cetonas conjugadas, na posição 3 (anel A) e uma cadeia lateral hidroxicetônica na posição 17 (anel D). Grupos cetona ou hidroxila são também comuns na posição 11 (anel C). Alguns glicocorticóides sintéticos apresentam substituições na posição 16, como a dexamentasona (R =OH) e a triancinolona (R=CH₃). O metabolismo de glicocorticóides envolve, normalmente, a hidroxilação da posição 6, como no 6-hidrocortisol e a redução dos grupamentos cetona presentes na posição 3, como no tetraidrocortisol e na tetraidrocortisona.

Anti-inflamatórios não-esteroidais

Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo heterogêneo de substâncias, que em geral não estão relacionados quimicamente, e que apesar disso, tem em comum certas ações terapêuticas, como atividade antipirética, analgésica e anti-inflamatória. Isto porque atuam na biossíntese das PGs, agindo diretamente na inibição de enzimas da via cicloxigenase, mas não na via lipoxigenase. Em geral, estas substâncias apresentam propriedades ácidas com valores de pK_a entre 4 e 5.

A aspirina é o protótipo dos AINEs; é o fármaco mais usado e aquele com o qual todos os demais agentes antiinflamatórios são comparados. Entretanto, cerca de 15% dos pacientes mostram intolerância à aspirina. Desta forma fez-se necessário buscar fármacos alternativos com maior atividade antiinflamatória, menor irritação gástrica, ou ainda de ação mais longa, diminuindo a dose diária administrada. Em geral os AINEs mais novos são consideravelmente mais caros que a aspirina e alguns são comparativamente mais tóxicos (HARVEY et al., 2000).

De forma geral, a atividade antiinflamatória dos AINEs tem mecanismo similar ao da aspirina, sendo mediada principalmente pela inibição da síntese das PGs. Em graus variáveis, todos os AINEs são inibidores da síntese de protrombina; todos são analgésicos, antiinflamatórios e antipiréticos; todos inibem a agregação plaquetária. Todos são, também irritantes gástricos, embora componentes desse grupo tendem a causar menor irritação gástrica que a aspirina. Observa-se cada vez

mais nefrotoxicidade em associação às drogas com as quais ocorre experiência mais ampla (NORTHEY, 1999).

A inflamação pode ser aguda, com duração relativamente curta apresentando os eventos vasculares como exsudação plasmática e neutrófilos; ou crônica, com duração mais longa e associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (RANG; DALLE; RITTER, 1997).

Segundo Wanmacher e Ferreira (1995), a inflamação refere-se à resposta inicial à lesão tecidual; é mediada pela liberação de mediadores químicos e, em geral, precede o desenvolvimento da resposta imune (fig. 6). Esta resposta acontece quando as células imunologicamente competentes são ativadas, reagindo a organismos estranhos ou substâncias antigênicas, liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica.

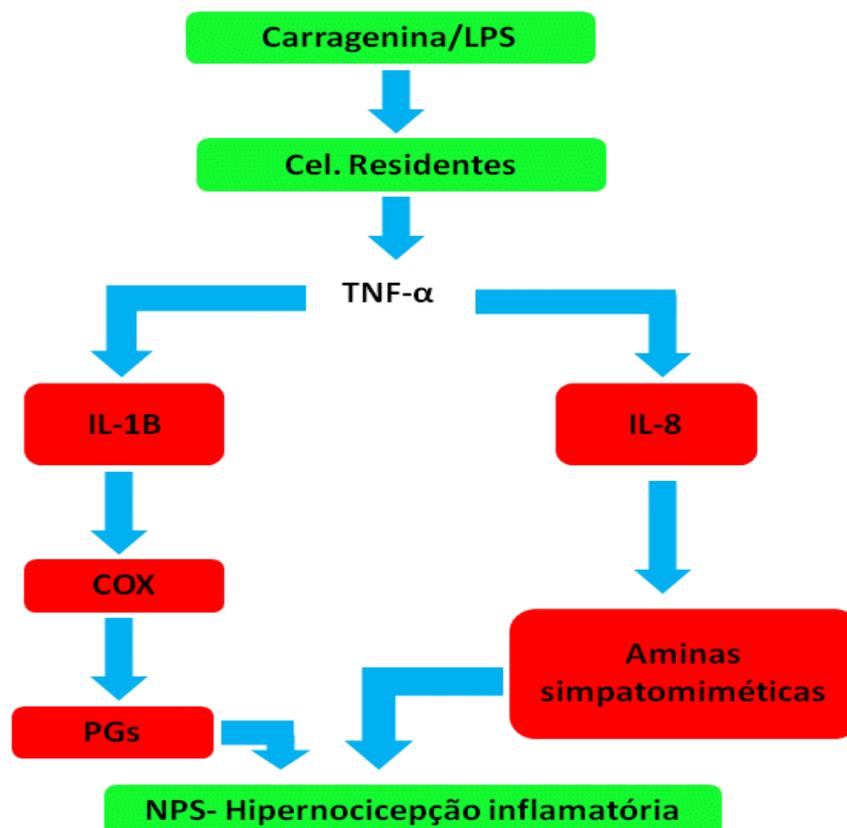


Figura 6- Ativação da cascata de citocinas*.

*Fonte: Kummer e col. (2002)

4.3.3 Processo da dor

A dor, como outras sensações, não é de fácil definição. Seu estudo também é difícil, sendo que o caminho mais seguro é utilizar a descrição verbal do homem, em experiências subjetivas da dor, sob condições experimentais controladas. Entretanto, manifestações fisiológicas de nocicepção, medulares podem ser associadas com dor em animais experimentais e podem ser utilizadas na avaliação de substâncias com propriedades analgésicas (GOOLDMAN & GILMAN, 2007).

O desenvolvimento de métodos para a medida da dor e seu alívio em animais de laboratório, tem sido incrementado significativamente nos últimos anos. O princípio da maioria deles se baseia na indução da dor através de um estímulo que, supostamente doloroso, previamente escolhido, que determina uma resposta mensurável de preferência quantitativamente, com valores diretamente proporcionais à intensidade do estímulo que, com a introdução de um procedimento ou substância é diminuída (analgésico) ou aumentada (algogênico ou hiperalgésico). Os principais métodos, ou pelo menos os de maior utilização, são os obtidos através do estímulo térmico (“Hot plate” ou “Tail-flick”) ou químico (teste da formalina e de contorções) (LAPA et al, 2008).

A dor é um sistema de alerta que informa ao hospedeiro que a parte lesada se protegida e que a retirada do agente da área pode ser uma medida prudente (fig. 7). Deve-se lembrar que a dor é uma sensação subjetiva. O impulso vai da área de agressão para o sistema nervoso central, mas no final, são centros cerebrais superiores que determinam a extensão da dor, e destes centros podem receber outros sinais que podem modificar a dor (TROWBRIDGE & EMLING, 1996).

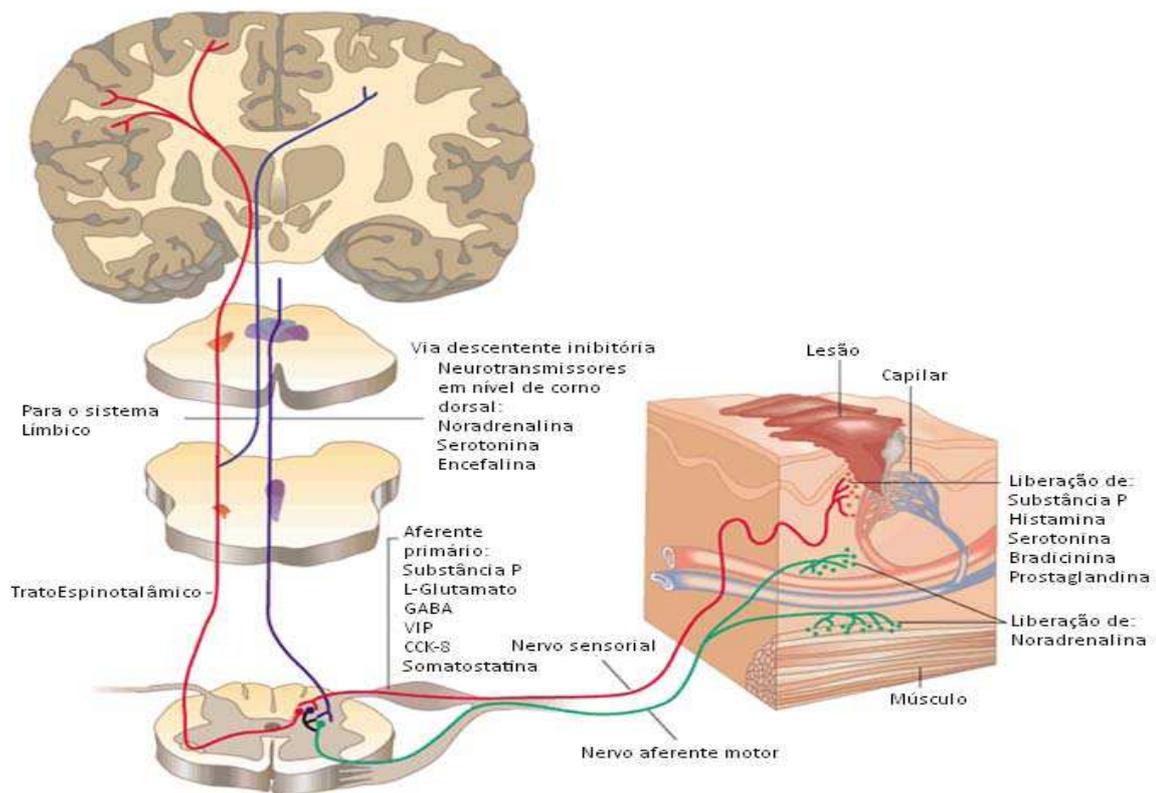


Figura 7- Representação esquemática do processo da dor

4.3.4 Analgésicos

Tendo em vista a complexidade e magnitude dos mecanismos mediadores envolvidos na hiperalgesia, o efeito reverso ou analgesia pode ser obtido por intermédio de diferentes drogas, com distintos mecanismos de ação, os quais podem atuar tanto central quanto periféricamente. As substâncias analgésicas conhecidas podem ser divididas em duas grandes classes: analgésicos opióides e drogas antiinflamatórias não esteróidas (DAINES), que além de antiinflamatórios, são analgésicos antipiréticos (REISINI e PATERNAK, 1996).

Ao primeiro grupo pertence a morfina e seus análogos. O termo opióide aplica-se a qualquer substância que produza efeitos semelhantes aos da morfina, aos quais são bloqueados por antagonistas do tipo naloxana. Este grupo inclui vários neuropeptídeos e análogos sintéticos, cuja estrutura pode ser bastante diferente daquela da morfina (REISINI & PATERNAK, 1996).

O termo mais antigo, opiáceo, é mais restritivo e significa medicamentos estruturalmente análogos a morfina excluindo-se dessa forma, os peptídeos e muitos

análogos sintéticos (Reisine e Pasternak, 1996). Tais drogas atuam em receptores específicos denominados Mu (μ), Sigma (δ) e Kappa (κ).

A maioria das drogas opióides utilizadas clinicamente, como é o caso da morfina, é relativamente seletiva para os receptores μ . Além disso, a morfina e outros agonistas opióides μ inibem seletivamente vários reflexos nociceptivos e induzem analgesia profunda quando administrados por via intratecal ou instilados localmente no corno dorsal da medula. Parece que pelo menos três mecanismos estão envolvidos: 1) os receptores de opióides, nas terminações dos nervos aferentes primários, medeiam a liberação de neurotransmissores; 2) a morfina também antagoniza os efeitos dos neurotransmissores por exercer ações inibidoras pós-sinápticas dos interneurônios e nos neurônios de efluxo do feixe espinotalâmico que transportam a informação nociceptiva para os centros mais altos dos cérebros; 3) os agonistas δ e κ parecem agir da mesma maneira; todavia, os agonistas κ só suprimem discretamente os estímulos térmicos nocivos e seus efeitos máximos na dor visceral são nitidamente menores (LEWIS et al, 1987).

Apesar da eficácia farmacológica da morfina, seu uso abusivo representa um problema social grave. Além disso, o uso da morfina e opióides correlatos, determinam um leque de efeitos indesejáveis, incluindo depressão respiratória, náusea, vômito, tonteira, sudorese, prurido, constipação, retenção urinária, hipotensão e dependência (Reisine e Pasternak, 1996). Tais problemas continuam estimulando pesquisas em busca de analgésicos potentes que não produzam dependência e com menor grau de efeitos colaterais.

Outro grupo de analgésicos é a dos DAINES, que incluem os salicilatos; aspirina, derivados da pirazolona, derivados da parafenolamina (fanacetina, paracetamol), indometacina, ácido mefenâmico, tolmetina, derivados do ácido propiônico e outros.

As DAINES, além de antiinflamatórios, são analgésicos suaves sendo eficazes somente contra dor moderada. Este efeito é analgésico provavelmente devido à prevenção da sensibilização do nociceptor, já que reduz a liberação dos mediadores químicos. O uso de DAINES para reduzir a dor e a inflamação de condições tais como artrite reumatóide e osteoartrite também é benéfico sob o ponto de vista de uso a curto prazo (SIDDALL & COUSINS, 1995).

Entretanto os DAINES compartilham efeitos colaterais indesejáveis. O mais comum é a tendência a produzir ulceração gástrica ou intestinal que, em alguns casos, pode acompanhar-se de anemia devida ao sangramento resultante. Dados epidemiológicos relatam que pacientes que usam DAINES por períodos longos tem risco relativo três vezes maior de desenvolver complicações gastrointestinais colaterais, em comparação com os pacientes que não usam estes medicamentos.

4.4 PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

A avaliação do potencial terapêutico de plantas e seus principais constituintes (tais como alcalóides, esteróides, triterpenos, taninos, saponinas, flavonóides, lignanas), tem sido objeto de estudos avaliando-se as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais, visando possibilidades de futuramente virem a ser aproveitados como agentes medicinais (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998).

Das várias aplicações terapêuticas dos vegetais, muitos apresentam atividade antiinflamatória e analgésica, sendo largamente utilizados na medicina popular. E por isso, há necessidade de pesquisas e estudos para comprovar tanto essas atividades, quanto um possível quadro tóxico, em ensaios biológicos (ROCHA, 2006).

Os produtos de origem natural podem ser tão eficazes quanto os produzidos pela síntese química. As plantas em particular contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes, contribuindo para a mesma atividade (MACIEL, PINTO E VEIGA, 2002).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças inflamatórias apresenta, fundamentalmente, influências da cultura indígena, africana e européia. Essas influências deixaram marcas profundas nas diferentes áreas da cultura brasileira, sob o aspecto material e espiritual, constituem a base da medicina popular que há algum tempo vem sendo retomada pela medicina natural. A medicina natural procura aproveitar suas práticas, dando caráter científico e integrando-as em um conjunto de princípios que visam não apenas curar algumas doenças, mas restituir o homem à vida natural (MARTINS et al, 2000).

Muitas plantas medicinais usadas popularmente para tratar condições inflamatórias apresentam triterpenóides exibindo ação anti-inflamatória *in vivo* e *in vitro*, incluindo supressão da síntese de prostanóide e citocinas, bem como a inibição da atividade enzimática e peroxidação lipídica. Em geral sesquiterpenos e triterpenos pentacíclicos tem sido reportados por exibir ação anti-inflamatória, antiulcerogênica e antinociceptiva (FERNANDES et al 2003).

Em trabalho realizado por Jain e colaboradores (1995) foi verificado que os triterpenos, como o ácido masticadienólico e o ácido masticadienólico (schinol), apresentam atividade anti-inflamatória por serem inibidores competitivos específicos da fosfolipase A₂.

Flavonóides e alguns compostos triterpênicos têm sido relatados por apresentar efeito inibitório da enzima lipoxigenase ou ciclooxigenase (KUPELI et al, 2006).

Alguns glicosídeos do ácido caféico apresentam seletiva inibição da 5-lipoxigenase, a qual está relacionada com a biogênese dos leucotrienos, estando estes envolvidos com a imunorregulação. Plantas ricas em taninos são empregadas tradicionalmente em doenças como diarréias, hipertensão, reumatismo, hemorragias, problemas estomacais; problemas renais e processos inflamatórios em geral. Saponinas como glicirrizinas têm demonstrado importante atividade anti-inflamatória (SHENKEL et al, 2000). Diversas atividades atribuídas às xantonas tais como inibição da agregação plaquetária e ação anti-inflamatória (LIN et al, 1996).

Existem numerosos agentes, obtidos de fontes naturais, de grande diversidade química, que envolvem diferentes tipos de princípios ativos. Entre eles se encontram triterpenos, esteróides, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides, cumarinas e alcalóides, que têm demonstrado atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre distintos mediadores desse processo (WAGNER, 1989). Isto constituiria uma fonte de descobrimento de novos agentes que poderiam exercer sua atividade anti-inflamatória por mecanismos distintos a dos fármacos AINES já existentes na terapêutica.

4.5 RELAÇÕES ENTRE OS PRINCIPAIS COMPOSTOS ISOLADOS DE *Arrabidaea brachypoda* (TRITERPENOS) E A BUSCA DE NOVOS MEDICAMENTOS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANALGÉSICA

Os triterpenóides têm bastantes propriedades medicinais, com grandes potencialidades em atividades biológicas: são anti-inflamatórios, bacterianos, fungicídicos, antivirais, analgésicos, antitumorais. Devido à sua grande diversidade o seu estudo tem sido de grande interesse na tentativa de novas e reais aplicabilidades (CONNOLLY & HILL, 2007).

É surpreendente a ampla abordagem farmacológica encontrada na literatura para os triterpenos e seus isômeros. Os usos tradicionais de plantas contendo triterpenos também são muitos e pode-se citar brevemente o uso como anti-inflamatório, hepatoprotetor, analgésico, cardiotônico, sedativo e tônico, sendo muitos desses usos comprovados cientificamente (CONNOLLY & HILL, 2007).

O gênero *Protium* por exemplo, além das características anti-inflamatórias popularmente conhecidas nas suas resinas, possui uma variedade de outros efeitos tem sido descritos na literatura, que incluem propriedades gastroprotetoras, hepatoprotetoras, cardioprotetoras, antioxidante, bactericida, antialérgicas, antitumorais, antivirais, ansiolíticas, antidepressivas e antinociceptivas, sendo estes efeitos atribuídos aos triterpenos pentacíclicos α -amirina e β -amirina presentes nas resinas (ARAGÃO et al., 2006).

Recentemente, demonstrou-se que os triterpenos α e β -amirina apresentam atividade anti-inflamatória em modelos de edema de pata induzido pela carragenina e dextrana em camundongos (Aragão et al., 2007) e edema de orelha induzido por vários agentes pró-inflamatórios (Medeiros et al., 2007), bem como foi eficaz em reduzir os níveis de MPO e TNF- α na periodontite induzida pela ligadura do dente (Holanda Pinto et al., 2008). Além disso, esses triterpenos quando administrados pelas vias sistêmica, espinhal e supraespinhal apresentaram significativo efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória e estes efeitos tem sido atribuídos à capacidade da α e β -amirina em interferir com a via de duas proteínas, a proteína quinase, a PKA e a PKC (OTUKI, FERREIRA et al., 2005).

Contudo, outros mecanismos foram propostos, com base em alguns experimentos nos quais foi demonstrado que os triterpenos α e β -amirina reduzem a

nocicepção visceral induzida pela administração intracolônica de capsaicina ou óleo de mostarda, bem como pela administração intraperitoneal de ciclofosfamida. Desta forma, acredita-se que os triterpenos α e β -amirina possam interagir com receptores opióides e vanilóides (TRPV1), bloquear a liberação de substância P, além de facilitar a abertura de canais de potássio dependentes do ATP e suprimir a expressão da enzima COX-2, talvez por bloqueio da ativação do fator nuclear kappa-B (MEDEIROS et al., 2007).

A α -Amirina, o lupeol, α -Amirina palmitato, lupeol palmitato, α -Amirina linoleato e lupeol linoleato foram examinados como sendo potenciais inibidores de sinais reguladores das enzimas proteicas de eucariontes, desde que outros triterpenóides tem mostrado serem potentes inibidores do cAK e do PKA (MENDES, 2004).

A inflamação crônica é associada com uma alta incidência de câncer. O processo inflamatório é geralmente acompanhado de estresse oxidativo, responsável por gerar mutações progressivas levando ao desenvolvimento tumoral. O ácido ursólico e outros triterpenóides comuns em plantas são muito bem conhecidos por sua atividade anti-inflamatória. Enzimas como iNOS e COX-2 estão envolvidas na inflamação, tendo papel importante na resposta dos tecidos ao dano e a agentes infecciosos. Apesar de a atividade fisiológica destas enzimas ser benéfica ao organismo, a excessiva expressão delas implica na patogênese de muitas doenças. Agentes que possam inibir a expressão ou a atividade destas enzimas geralmente induzidas por citocinas inflamatórias são potenciais agentes anti-inflamatórios e quimiopreventivos (GOSMANN, 2009).

Desta maneira, triterpenos sintéticos derivados do ácido oleanólico e ácido úrsólico foram testados quanto modulação dos níveis de enzima iNOS e COX-2 em macrófagos de camundongos ativados por citocinas inflamatórias. O resultado foi uma diminuição na taxa de transcrição destas duas enzimas que foi relacionado com a supressão do fator de transcrição destas duas enzimas que foi relacionado com a supressão do fator de transcrição NF- κ B, crítico para a indução de enzimas como iNOS e COX-2 (Honda, 1997). Este modelo foi usado por Honda e colaboradores para avaliar a atividade anti-inflamatória e quimiopreventiva de diversos outros derivados sintéticos oleanano e ursano.

5 PARTES EXPERIMENTAIS

5.1 MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS

- ✓ Extratos foram obtidos por processos de extração contínua através de aparelho de Soxhlet e concentrados em evaporador rotatório.
- ✓ Nos processos de cromatografia em coluna (CC) utilizou-se sílica gel 60 [70 a 230 Mesh (0,063 – 0,200 nm) ou 230 – 400 Mesh (0,200 – 0,360 nm), ASTM], Merck, em suporte de vidro de diâmetro interno adequado para cada caso.
- ✓ Nos processos de cromatografia em camada delgada (CCD) usou-se sílica gel 60 G Merck, na espessura de 0,25 mm (analítica).
- ✓ As frações obtidas em CC foram agrupadas de acordo com perfil cromatográfico em CCD e concentradas em evaporador rotatório.
- ✓ Como reveladores foram utilizados vapores de iodo; solução etanólica de FeCl_3 a 1%; luz ultravioleta ($\lambda = 254$ ou 365 nm); solução (1:1) de vanilina a 1% em etanol com solução de ácido sulfúrico a 3% em água destilada. Depois de borrifadas, as placas cromatográficas foram submetidas a aquecimento a 105°C conforme Matos, 2008.
- ✓ O critério de pureza adotado para as substâncias isoladas foi a obtenção de uma só mancha na placa cromatográfica, utilizando diferentes sistemas de eluentes e Temperatura de fusão.
- ✓ As temperaturas de fusão obtidos em graus Celsius foram determinados em aparelho Metler PFM 2, pertencente ao Laboratório Interdisciplinar de Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).
- ✓ Os espectro na região do infravermelho foi obtido em Espectrofotômetro Shimadzu IR-408 da Universidade Federal de Viçosa e da UNIFAL. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de brometo de potássio (KBr) e as absorções expressas em número de ondas (cm^{-1}).
- ✓ Os espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker AVANCE DRX-400 ou em Bruker AVANCE DPX-200 MHz, do Laboratório de

essonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química, ICEX, UFMG.

- ✓ Nos experimentos de RMN foi utilizado como referencial interno, o sinal relativo ao tetrametilsilano (TMS) para o qual o deslocamento químico do hidrogênio (δ_H) é igual ao do carbono ($\delta_C = 0,00$). Solvente deuterado utilizado foi $CDCl_3$.
- ✓ Os deslocamentos químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J), em Hertz (Hz).
- ✓ Nos ensaios Farmacológicos foram utilizados Hidropletismômetro modelo 7150, Ugo Basile, e placa-quente modelo TKA RH basic KTLC, Seringas plásticas B-D-Plastipak, Material cirúrgico, Microscópico Óptico Binocular Nikon, Banho Maria: Modelo Q-209 Quimis, agitador de Tubos VORTEX, AP 56-PHOENIX.

5.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Raízes, folhas e caules de *Arrabidaea brachypoda* foram coletadas em abril de 2008 nas áreas de cerrado da fazenda San't Ana da Serra, situada no município de João Pinheiro (MG). A ratificação taxonômica foi realizada pela Prof^a Dr^a Ana Maria Cristina Braga Messias do Instituto de Botânica da Universidade Federal de Ouro Preto, sendo que no Herbário José Badine do Instituto de botânica da UFOP, se encontra catalogada uma exsicata sob o número 17935.

Como material de estudos foram utilizadas cascas de raízes, folhas e caules de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau. As partes coletadas da espécie vegetal foram previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45°C durante 7 dias. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem.

Após secagem completa, as cascas de raízes, folhas e caules foram trituradas em moinho de facas e pesadas dando origem a 798,23 g de cascas de raízes, 1032,45g de folhas e 987,98 g de caules.

5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Arrabidaea brachypoda*

Preparo dos extratos

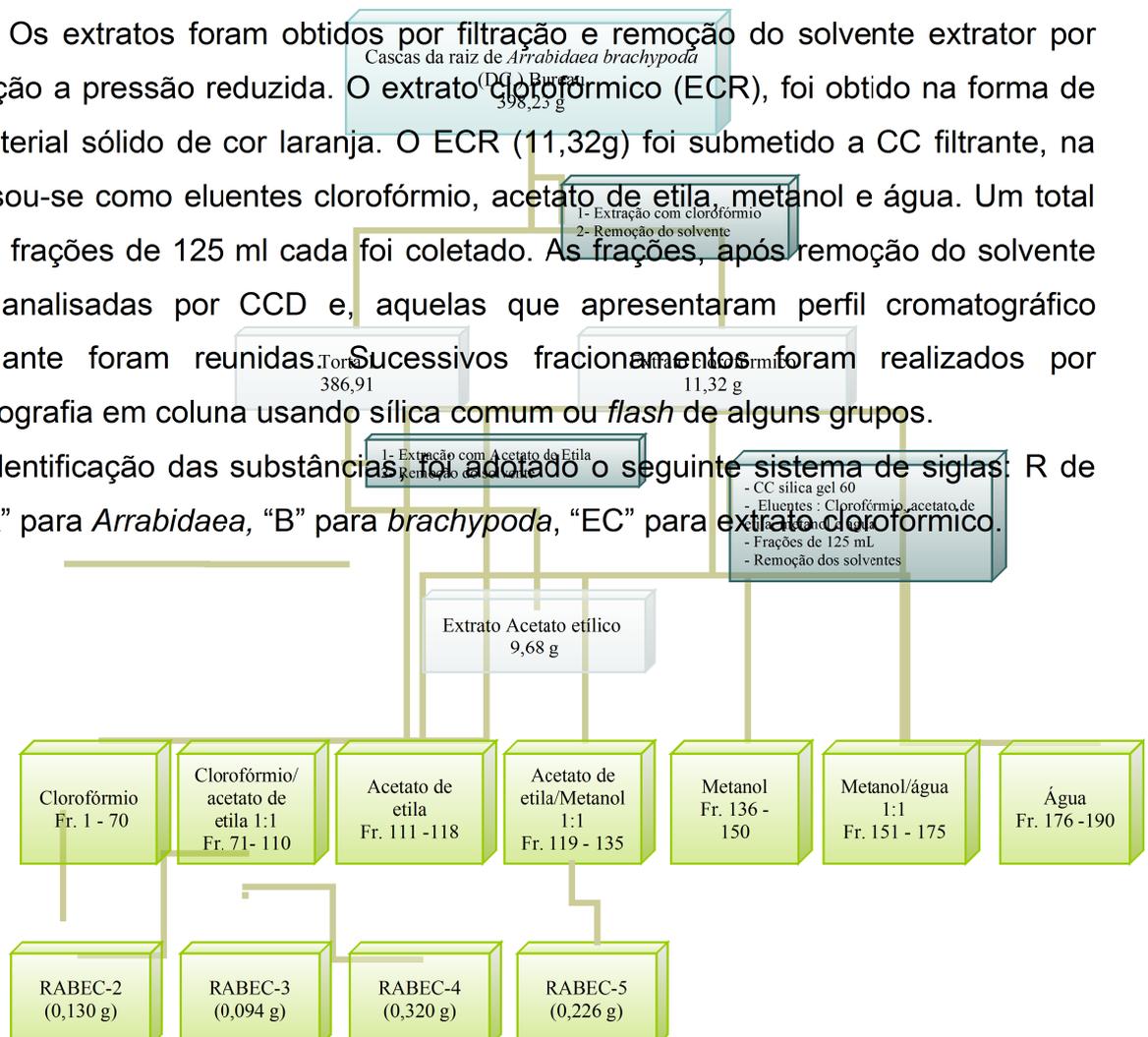
Cada parte foi submetida à extração exaustiva em extrator de Soxhlet, utilizando como solventes extratores o hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol, seqüencialmente. As seqüências dos procedimentos adotados na elaboração dos extratos estão esquematizadas nas figuras 8, 9 e 10.

A nomenclatura dos extratos foi feita da seguinte forma: letra “E”, para extrato; “H” para hexano; “C” para clorofórmio, “A” para acetato de etila; “E” para etanol, “F” para folhas, “R” de raízes e “G” para caule (Galhos).

5.3.1 Obtenção e fracionamento do extrato clorofórmico das cascas de raízes de *Arrabidaea brachypoda*

Cascas de raízes (398,23 g) foram submetidas à extração a quente em aparelho de Soxhlet, usando como solvente extrator clorofórmio, acetato de etila e etanol. Os extratos foram obtidos por filtração e remoção do solvente extrator por destilação a pressão reduzida. O extrato clorofórmico (ECR), foi obtido na forma de um material sólido de cor laranja. O ECR (11,32g) foi submetido a CC filtrante, na qual usou-se como eluentes clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Um total de 190 frações de 125 ml cada foi coletado. As frações, após remoção do solvente foram analisadas por CCD e, aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante foram reunidas. Sucessivos fracionamentos foram realizados por cromatografia em coluna usando sílica comum ou *flash* de alguns grupos.

Para identificação das substâncias foi adotado o seguinte sistema de siglas: R de raiz, “A” para *Arrabidaea*, “B” para *brachypoda*, “EC” para extrato clorofórmico.



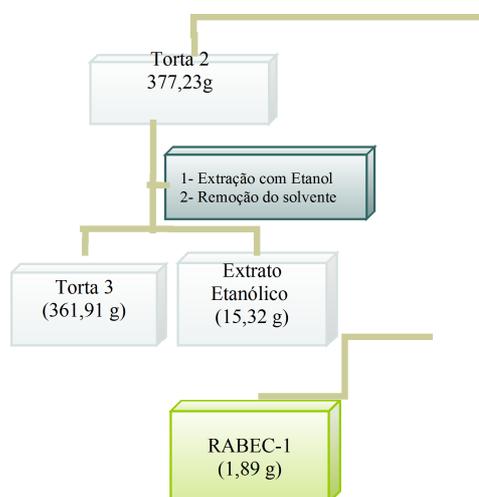


Figura 8- Fracionamento do extrato clorofórmico das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau

Frações de 1-3 –obtenção de RABEC-1

O grupamento 1 (frações 1-3), apresentou-se como uma substância sólida e de cor esbranquiçada. A análise por CCD utilizando-se diferentes eluentes demonstrou a presença de um único componente. Essa substância, codificada como RABEC-1 foi submetida ao teste de Lieberman-Buchard para verificar a presença de esteróides ou triterpenos. Para tal, redissolveu uma mínima quantidade do sólido em 3 mL de clorofórmio, juntou ao extrato clorofórmico 2 mL de anidrido acético. Agitou suavemente e pelas paredes do tubo adicionou 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A presença de uma coloração rósea confirmou a natureza triterpênica da substância. Determinou-se a temperatura de fusão, encontrando-se valores situados entre 46 e 50°C. RABEC-1 foi submetida a métodos físicos de análise (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C , incluindo DEPT e 2D) e posteriormente identificada como sendo 3β -esteariloxi-olean-12-eno.

Frações de 71-85 –obtenção de RABEC-2 e RABEC-3

O grupamento 2 (frações 71-85), apresentou ao ser eluído com clorofórmio e acetato de etila na proporção 1:1, duas manchas com polaridades bem distintas, com isso o mesmo foi submetido a uma coluna “flash”, utilizando como solvente

clorofórmio e acetato de etila (1:1). Foram coletadas no total 15 frações de 30 mL cada uma. Essas frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em três grupos distintos. Verificou-se que o grupo constituído das frações de 1-5 dessa coluna, e o grupo das frações 13-15 apresentavam uma única mancha na placa cromatográfica. As duas substâncias foram submetidas ao teste de Lieberman-Burchard apresentando resultado positivo para triterpenos pentacíclicos. Foram então codificadas como RABEC-2 e RABEC-3 respectivamente e submetidas às técnicas de identificação. Após análise dos seus espectros e comparação com padrões autênticos concluiu-se que as substâncias isoladas se tratavam do ácido betulínico (RABEC-2) e de uma mistura de α e β -amirina (RABEC 3).

Frações de 86-110- obtenção de RABEC-4

As frações de 86-110, após adição de hexano mostrou um precipitado branco e em seguida a mesma foi filtrada onde o sólido após CCD não mostrou-se puro. Novamente esse sólido branco foi submetido a uma coluna, utilizando como eluente uma mistura de clorofórmio e acetato de etila (6:4). Foram coletadas no total 20 frações. As frações 3, 4, 5, 6 apresentaram sólidos após evaporação do solvente. Estas foram submetidas a CCD. A fração 3 mostrou em perfil cromatográfico apenas uma mancha. Isso conduziu a hipótese de que a substância poderia estar pura. Logo após, realizou-se o teste de Lieberman-Burchard para verificar a presença de esteróides ou triterpenos e o resultado foi positivo para triterpenos. Após análise espectral na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C verificou que a substância se tratava do ácido oleanólico (RABEC 4).

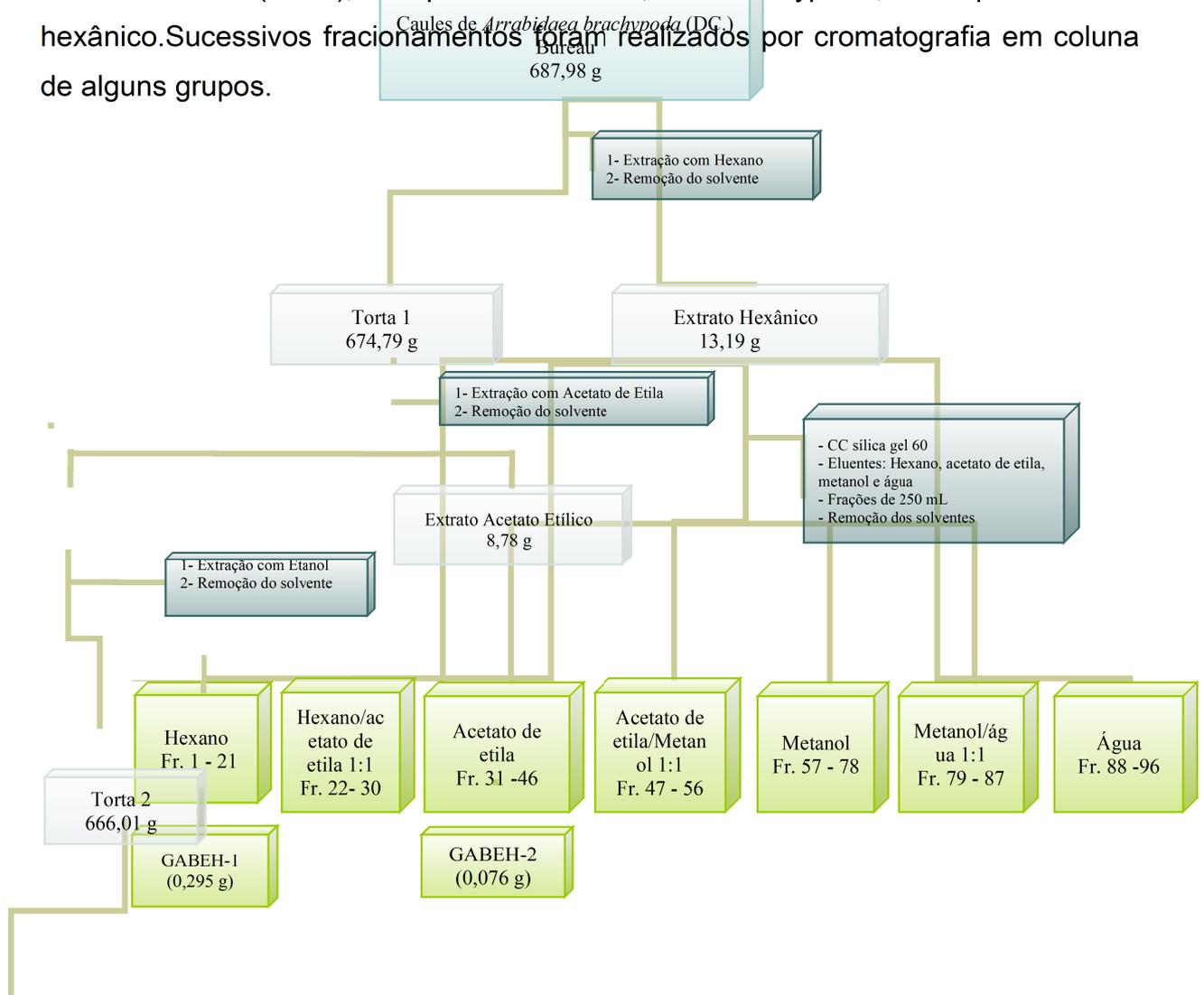
Frações de 120-128 –obtenção de RABEC-5

O grupo constituído das frações 120-128, mostrou após análise em CCD em diferentes misturas de solventes, como uma substância pura. Isso conduziu a hipótese de que a substância poderia estar pura. Logo após, realizou-se o teste de Lieberman-Burchard para verificar a presença de esteróides ou triterpenos e o resultado foi a presença de uma coloração azulada, que posteriormente passou para verde persistente, o que caracterizou teste positivo para esteróide. Após análise espectral na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C verificou que a substância se tratava do β -sitosterol (RABEC 4).

5.3.2 Obtenção e fracionamento do extrato hexânico do caule de *Arrabidaea brachypoda*

Caules secos e moídos (687,98 g) de *Arrabidaea brachypoda* foram submetidos a extração a quente em aparelho de soxhlet, utilizando como solvente extrator hexano, acetato de etila e etanol. O extrato hexânico dos caules (13,19g) de *Arrabidaea brachypoda*, foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluente hexano, acetato de etila, metanol e água, puro ou em misturas, na ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 96 frações de 250 ml cada. Por CCD comparativas foi possível reuni-las em 9 grupos. Todos os grupos apresentaram uma pequena quantidade de material. A grande maioria dos grupos apresentou uma complexidade muito grande em relação a sua constituição. A análise por CCD destes grupos apresentou um grande número de substâncias para a maior parte dos grupos.

Para identificação das substâncias, foi adotado o seguinte sistema de siglas: “G” de Galhos (caule), “A” para *Arrabidaea*, “B” *brachypoda*, “EH” para extrato hexânico. Sucessivos fracionamentos foram realizados por cromatografia em coluna de alguns grupos.



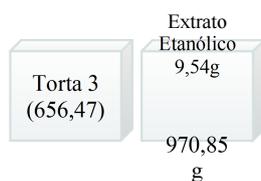


Figura 9- Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico do caule de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau

Frações de 1- 10- obtenção de GABEH-1

As frações de 1-10, após evaporação do hexano, mostraram-se como um material oleoso e incolor. Esse material foi submetido à análise por CCD, utilizando eluentes de diferentes polaridades e solução de vanilina em ácido sulfúrico como reveladores. Por CCD o grupo mostrou-se como sendo constituído por um único componente. Esse material foi também submetido a análise no infravermelho. Posteriores análises por cromatografia a gás acoplada ao espectrometria serão realizadas para detectar a presença do (s) componente (s) presentes neste grupo. Esse material foi codificado como GABEH-1.

Frações de 35-46 - obtenção de GABEH-2

O grupo constituído das frações 35-46 mostrou após análise em CCD em diferentes misturas de solventes, como uma substância pura. Isso conduziu a hipótese de que a substância poderia estar pura. Logo após, realizou-se o teste de Lieberman-Burchard para verificar a presença de esteróides ou triterpenos e o resultado foi a presença de uma coloração rósea, o que caracterizou teste positivo para triterpenos. Após análise espectral na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C verificou que a substância se tratava do lupeol (GABEH-2).

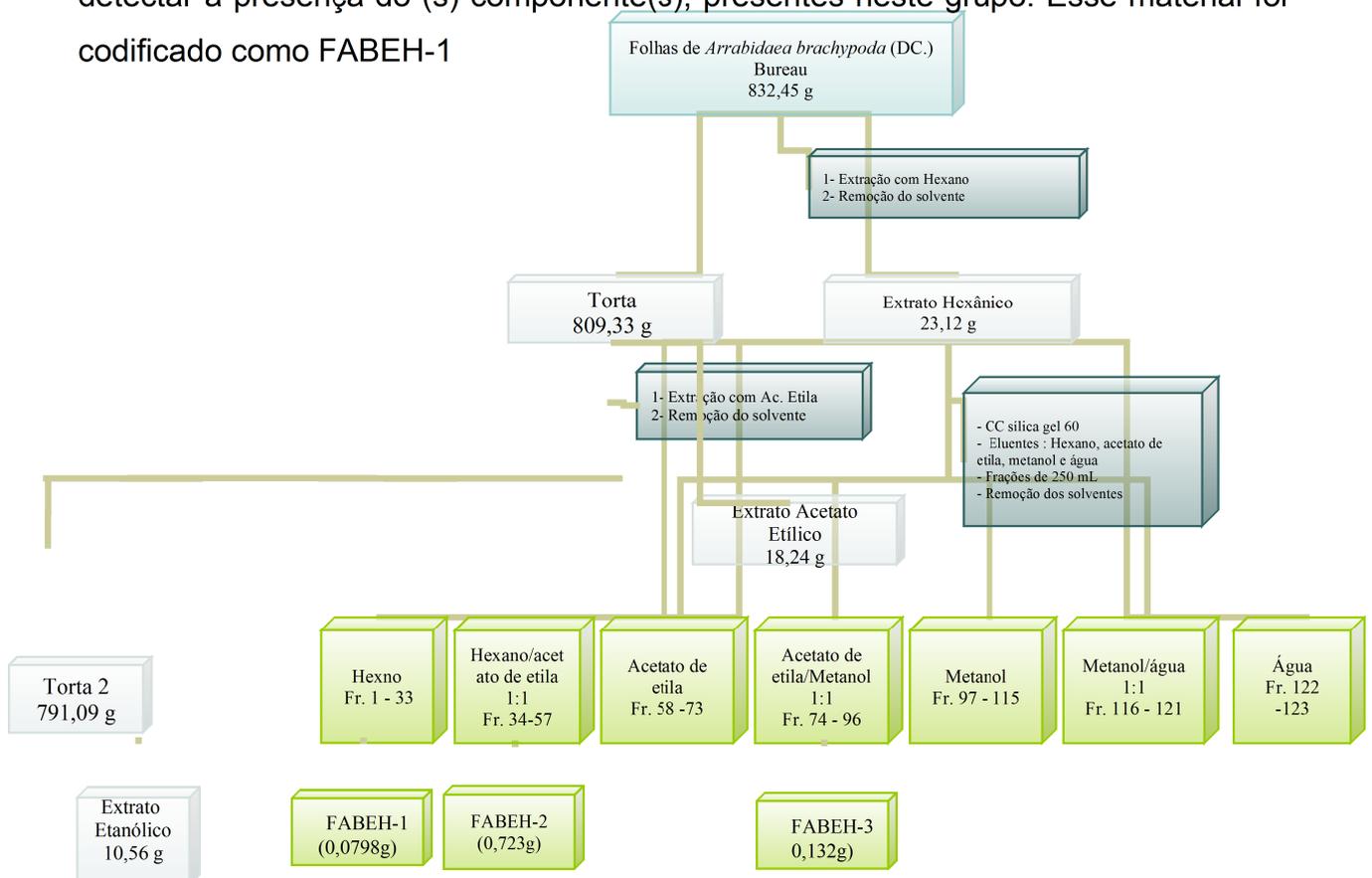
5.3.3 Obtenção e fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Arrabidaea brachypoda*

Folhas secas e moídas 832,45 g de *Arrabidaea brachypoda* foram submetidas a extração em aparelho de soxhlet, utilizando como solvente extrator hexano, acetato de etila e etanol. O extrato hexânico das folhas de *Arrabidaea brachypoda*, foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando como eluentes hexano, acetato de etila, metanol e água, puro ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 123 frações de 125 ml cada. Por CCD comparativas foi possível reuní-las em 17 grupos similares.

Para identificação das substâncias, foi adotado o seguinte sistema de siglas: “F” de Folhas, “A” para *Arrabidaea*, “B” para *brachypoda*, “EH” para extrato hexânico. Sucessivos fracionamentos foram realizados por cromatografia em coluna de alguns grupos.

Frações 1-15- Obtenção de FABEH-1

As frações de 1-15, após evaporação do hexano, mostraram-se como um material oleoso de cor amarela. Esse material foi submetido à análise por CCD, utilizando eluentes de diferentes polaridades e vapor de iodo e solução de vanilina em ácido sulfúrico como reveladores. Por CCD o grupo mostrou-se como sendo constituído por um único componente. Esse material foi também submetido a análise de infravermelho. Posteriores análises por cromatografia a gás serão realizadas para detectar a presença do (s) componente(s), presentes neste grupo. Esse material foi codificado como FABEH-1



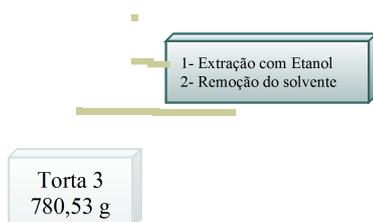


Figura 10- Fluxograma do fracionamento das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau

Frações 35-43- obtenção de FABEH-2

Esse grupo mostrou-se como um sólido amarelo, mas com um resíduo oleoso (amarelo). O material foi lavado várias vezes com hexano e a parte sólida foi recristalizada com clorofórmio-metanol, obtendo uma substância sólida e de cor esbranquiçada. Após comparação por CCD com vários padrões autênticos observou-se que a substância isolada apresenta o mesmo Rf da friedelina. Foram realizadas análises na região do IV, RMN de ^1H , e ^{13}C e determinação da temperatura de faixa confirmando a estrutura dessa substância como sendo friedelina que foi codificada como (FABEH-2). O resíduo oleoso obtido pela lavagem com hexano, foi analisado em CCD, juntamente com o material obtido do grupo (1-15), usando como eluente uma mistura de Hexano/Acetato (7:3) e os mesmos apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, por isso foram agrupados.

Frações 74-79- obtenção de FABEH-3

Apresentou-se como um sólido branco e com um perfil cromatográfico para uma possível separação dos constituintes, com isso a mesma foi submetida a uma coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh). Através desse processo foram obtidas 54 frações. Após análise de CCD observou-se que as frações 14-19 apresentaram-se como uma única mancha na placa e com mesmo perfil cromatográfico. No teste de LB a substância apresentou resultado conclusivo para triterpenos pentacíclicos. Foram realizadas análise de IV, RMN de ^{13}C e ^1H e determinação da temperatura de fusão, e concluiu-se que a substância isolada codificada como (FABEH-3), se tratava do lupeol.

5.4. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

5.4.1 Obtenção dos extratos etanólicos brutos de *Arrabidaea brachypoda* para bioensaios

A preparação dos extratos brutos para posterior realização dos ensaios farmacológicos partiu da maceração de 700g de cada parte da planta (raiz, caule e folha) secos e triturados em moinho. Foi utilizado o solvente etanol (EtOH) por um período total de dez dias, tendo sido realizadas três extrações neste período, cada uma delas com dois litros do solvente. Houve agitação manual a cada 24h. Após o período de maceração ocorreu a filtragem e redução do solvente em evaporador rotativo à pressão reduzida. O esquema para obtenção e a realização dos ensaios dos extratos brutos encontra-se na Figura 11.

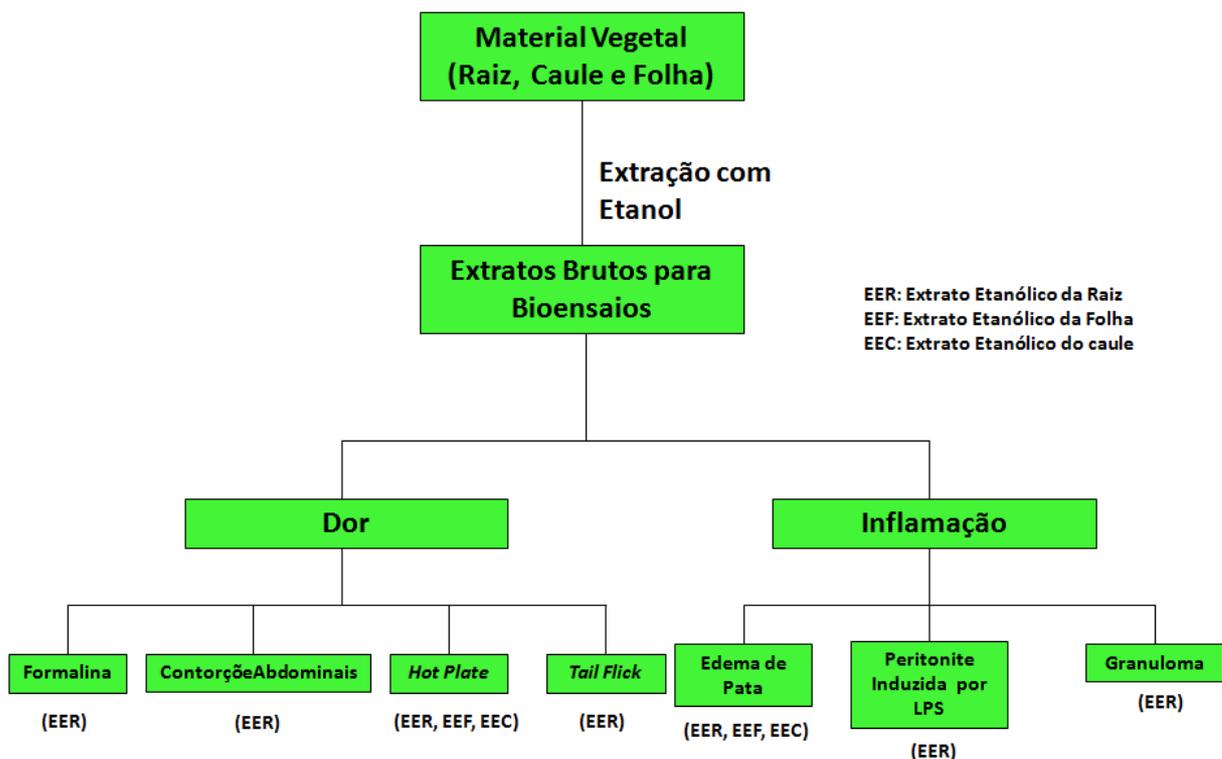


Figura 11- Esquema da obtenção dos extratos brutos de *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau e avaliação nos modelos de inflamação e dor.

5.4.2 Avaliação da atividade analgésica de *Arrabidaea brachypoda*

Sistema de teste *in vivo*

Foram utilizados camundongos Swiss (20-25 g) machos provenientes do Biotério da UNIFAL-MG. Os animais fornecidos foram mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Dez horas antes da realização das experiências, os animais foram privados de ração. Os protocolos utilizados foram encaminhados ao Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição e aprovados sob o número 210/2009.

- **Teste da formalina**

O teste foi realizado de acordo com Hunskaar e Hole (1987). Camundongos receberam uma injeção de 20 μL de formalina 2,5% (em salina estéril) no espaço subplantar da pata direita e a duração da lambida foi determinada de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase), após aplicação da formalina. Os extratos e composto foram solubilizados em CMC (1%v/v) e administrado nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, por via oral, 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controle receberão 10mL/kg de CMC (1%,v/v) em salina por via oral. Morfina (10 mg/ Kg) e indometacina(10 mg/Kg) foram usadas como fármacos de referência.

- **Teste de contorções abdominais**

O teste de contorções abdominais em camundongos foi realizado de acordo com Koster et al., 1959. Os extratos e composto foram solubilizados em CMC (1%,v/v) e administrado por via oral 1 hora antes da aplicação do ácido acético 0,6%. As doses administradas dos extratos foram de 30, 100 e 300 mg/Kg para o EER, 200 e 400 mg/kg peso de camundongo (n =8) para os EEF e EEC. Para o compostos RABEC-1, foram usadas as doses de 5, 10 e 15 mg/Kg.

Uma hora após tratamento, 10 mL/kg de ácido acético 0,6% foram administrados intraperitonealmente em cada camundongo e o nº de contorções abdominais contado entre 10 e 30 minutos após este procedimento. O grupo controle recebeu

0,3 mL/30 g de carboximetilcelulose (1%, m/v) em salina por via oral (v.o.). A indometacina e morfina (10 mg/kg) foram os fármacos de referência.

- **Teste de “Tail-Flick”**

O modelo do tail-flick permite a obtenção de informações adicionais sobre o mecanismo e o local da atividade antinociceptiva detectada, uma vez que o parâmetro avaliado-reflexo da retirada da cauda- é de integração medular. Para determinar o efeito dos extratos na resposta de retirada de cauda dos animais, foi utilizada a metodologia descrita por Alviano et al. (2004). Os animais foram colocados no interior de um pequeno cilindro, deixando apenas sua cauda livre. Após a administração do extrato, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, via oral, 2/3 da cauda do animal foi imersa em banho-maria (50 ± 1 °C), sendo registrado o tempo que o animal permanecia com a cauda dentro do banho, determinando-se assim o tempo de latência (em segundos). Foram feitas marcações nos tempos de 30, 60 e 120 minutos após a administração dos extratos. Os resultados foram expressos como valor de potencial analgésico (PA) (Kuraishi et al., 1983), obtido através da fórmula:

$$PA = \frac{\text{Valor Medido} - \text{Valor basal}}{\text{Valor Tempo de Corte} - \text{Valor basal}} \times 100$$

onde o valor basal foi obtido através da média de duas aferições realizadas com cada animal antes dos tratamentos. O tempo de corte foi fixado em 10 s, a fim de evitar danos aos animais. Como controle positivo utilizou-se morfina (10 mg/kg).

- **Teste da *hot plate* (placa quente)**

Os animais (n = 8) foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) e o tempo (s) que cada animal gastou para retirar uma pata traseira da placa de alumínio e levá-la à boca (tempo de latência) foi cronometrado. Foram realizadas medidas repetidas nos tempos 0 e +15 sendo o tempo zero instituído como sendo 60 minutos após o tratamento com extratos (foram solubilizados em carboximetilcelulose (1%,m/v) e administrados na dose de 200 mg/kg; v.o. ou com

igual volume de água destilada (v.o.) e o tempo +15 será instituído como 15 minutos após o tempo zero. Com o objetivo de se evitar danos às patas dos animais foi estabelecido um tempo de corte de 30 segundos. Morfina (7,5 mg/kg; i.p.) foi administrada 45 minutos antes do tempo zero.

Teste da atividade exploratória

- **Teste do Campo Aberto**

O modelo do campo aberto tem importante valor para testar agentes farmacológicos que produzem depressão do sistema nervosa central. O procedimento utilizado foi similar ao descrito por Rodrigues e colaboradores (2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O chão da caixa foi dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com todas as patas foi contado por um período de 5 min. Camundongos foram tratados com o EER (30-300 mg/kg, v.o) ou veículo (10 ml/kg, i.p.).

5.4.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

Sistema teste in vivo

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNIFAL-MG e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos adultos (160-170g) aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais submetidos a jejum de 12 horas.

- **Edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina**

Neste experimento, foram utilizados 6 ratos *Wistar* machos adultos (160-170g), por grupo. Os extratos de *Arrabidaea brachypoda* foram administrados por via oral (v.o.) em concentrações variadas; outro grupo recebeu solução de

carboximetilcelulose (1%), 10ml/Kg (v.o.) e um controle positivo com indometacina (10mg/Kg) (v.o.). Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina 1% em solução fisiológica na pata traseira esquerda. O volume da pata do animal foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) submergindo as patas esquerdas posteriores dos animais, até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução de extran neutro 2,5% em salina 0,9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registrados no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção do agente flogístico

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média, para cada grupo de tratamento.

- **Peritonite Induzida por LPS**

Para a realização deste teste foi utilizado o protocolo experimental proposto por Ferrandiz e Alcaraz (1991), onde grupos de 10 animais foram tratados com CMC 1% (10 ml/Kg; p.o), extratos nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg e dexametasona (1mg/Kg; p.o; controle positivo do teste). Decorridos 60 minutos, estes animais recebem uma injeção i.p. de 0,25 mL LPS. Depois dos tratamentos, os animais foram devolvidos às caixas e deixados com livre acesso à ração e à água durante 4 horas. Após esse tempo, os animais foram anestesiados e mortos por exsanguinação. O exsudato peritoneal foi coletado com uma pipeta de Pasteur plástica através de laposcopia abdominal. Para facilitar a coleta, todos os animais recebem uma injeção de 10 mL de PBS heparinizado (5UL/mL), massageando-se o abdômen para soltar as células aderidas. Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Turk e a células foram contadas em câmara de Neubauer.

- **Teste do granuloma**

Grupos de 6 animais foram divididos em: grupo tratado extrato 30 mg/kg, grupo tratado extrato 100 mg/kg, grupo tratado extrato 300 mg/kg, grupo controle positivo tratado com dexametasona 5 mg/kg e grupo controle negativo administrado água. Estes foram mantidos sete dias, e durante o desenvolvimento do estudo, a uma temperatura de 20 ± 2 °C, e umidade relativa 50-70% em um ciclo de claro e escuro de 12/12 h. Tiveram livre acesso ao alimento (dieta padrão para roedores) e água. Todos os procedimentos foram realizados segundo recomendações do Comitê Internacional para os cuidados dos animais e estão em acordo com os regulamentos nacionais estabelecidos para a experimentação animal.

-Implante dos blocos de algodão

Os blocos de algodão com peso aproximado de 40 ± 5 mg foram secos a 60 °C durante 18 horas em estufa, posteriormente foram anotados os pesos e esterilizados em autoclave. Utilizando a metodologia descrita por Bailey, os animais foram pesados e em seguida, injetados tiletamina (50 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por animal, por via IM. A região abdominal do rato foi lavada com sabão, após foi raspada e desinfetada com solução anti-séptica PVPI. Fez-se uma incisão em torno de 6 mm na linha média da zona ventral, posteriormente separou-se cuidadosamente a derme da parede do peritônio e com o auxílio de uma pinça hemostática reta realizou-se túneis até as laterais, de uma amplitude aproximada de 1 cm e longitudinalmente de 5 cm, pela qual se introduziu o bloco de algodão.

Uma vez situado o bloco no final do túnel, o mesmo foi fechado com um ponto externo para que o bloco de algodão não se deslocasse. Repetiu-se o procedimento anterior para as quatro extremidades do abdômen do rato, foram implantados quatro blocos de algodão em cada animal. Ao final dos implantes suturou-se a incisão inicial com pontos de seda cirúrgica. Em seguida, aplicou Nitrofurazona (ungüento) para evitar o canibalismo e proteger os animais de possíveis infecções.

Após o ato cirúrgico, os animais foram colocados imediatamente em incubadora a 37 °C durante 3 h (recuperação da anestesia). Posteriormente foram

colocados no local de permanência nas condições padrão de trabalho. Para evitar infecções foram mantidos em viruta estéril.

Tratamento dos animais

Administrou-se por via oral, através de sonda intragástrica respectivamente durante 7 dias para os grupos tratados com extrato de etanólico de *Arrabidaea brachypoda* 30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg, para o grupo controle positivo tratado com dexametazona 5 mg/kg e para o grupo controle negativo água, administrando os mesmos volumes em todos os animais.

Extração do granuloma

Sete dias depois da implantação do bloco de algodão, os animais foram novamente pesados, e procedeu-se a eutanásia para a extração dos granulomas. Após serem cuidadosamente extraídos, os mesmos foram lavados com solução fisiológica e colocados em placas de petri. Os granulomas foram secos em estufa a 60 °C por 18 horas, e em seguida pesados em balança analítica.

5.4.4 Estudo de toxicidade aguda (Iork, 1983)

Foram preparados soluções dos extratos secos. Os camundongos foram randomicamente divididos em grupos (n=6) e administrados oralmente com 0,5 de solução do extrato etanólico bruto das raízes (EER), caule (EEC) e folhas (EEF). Os extratos testes foram administrados em uma dose por gavagem através da sonda gástrica. Os animais foram observados durante sete dias após receberem os extratos.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram conduzidos por delineamento inteiramente casualizado, tendo como parcela um animal. Foi conduzida análise de variância dos dados expressos por média \pm erro padrão da média, satisfeitas as premissas do método, seguido por teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Foi aceito como significativo o resultado que apresentou o P-valor menor que 0,05 em todos os

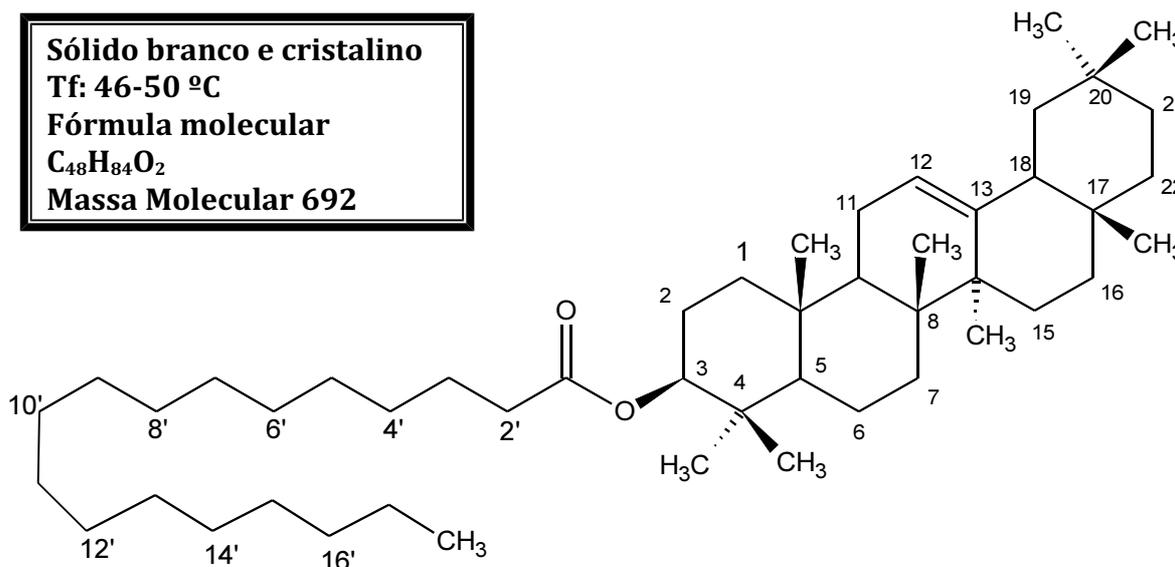
cálculos. Foi utilizado pacote estatístico GraphPad Prisma[®], versão 3.0, para os cálculos de ajuste não linear dos dados, e GraphPad InStat[®] (versão 3.01, EUA), para os cálculos de estatística inferencial.

6 RESULTADOS

6.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO EXTRATO CLOROFÓRMICO DAS RAÍZES DE *Arrabidaea brachypoda*

RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno)

Sólido branco e cristalino
Tf: 46-50 °C
Fórmula molecular
C₄₈H₈₄O₂
Massa Molecular 692



RABEC-1 apresentou Tf 46-50 °C. Quando submetido ao teste de Lieberman-Burchard, apresentou resultado conclusivo para triterpenos pentacíclicos. A análise do espectro no IV (fig. 12) evidenciou a natureza alifática de RABEC-1, através das bandas de absorção em 2920, 2850 e 1450 cm⁻¹ e mostrou também a presença de um grupo carbonila de éster, caracterizado pela banda em 1730 cm⁻¹.

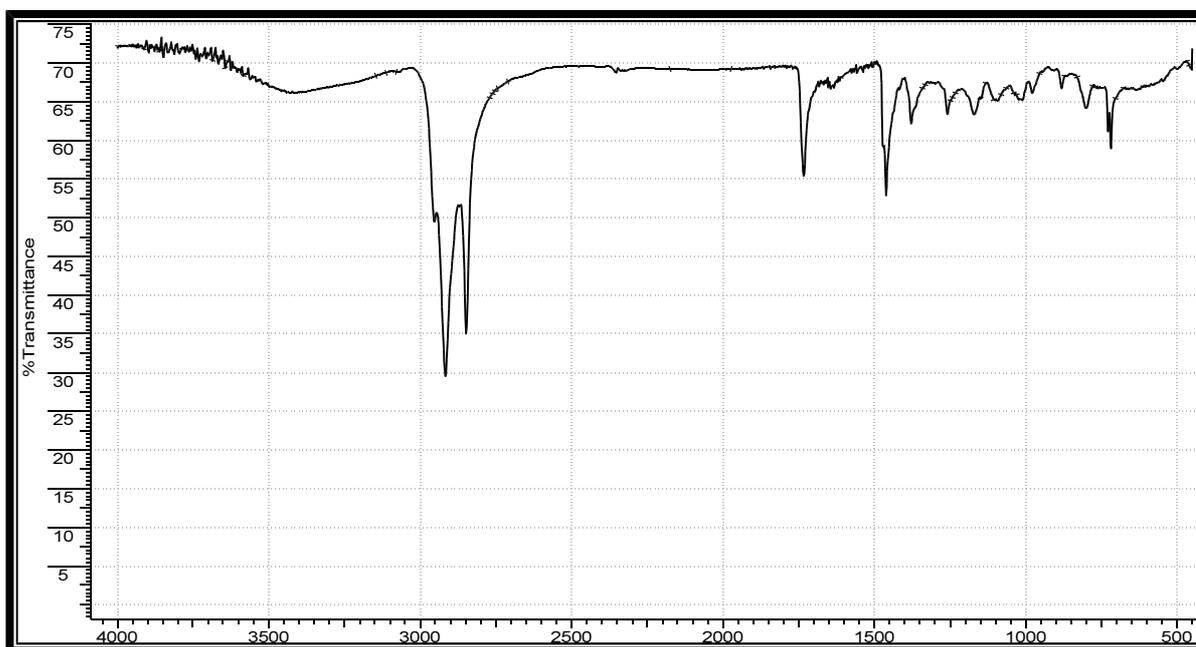


Figura 12. Espectro no IV para o 3β-esteariloxi-olean-12-eno) (KBr, cm⁻¹).

O aparecimento do sinal em δ_H 5,20 no espectro de RMN de ¹H (Fig. 13), dos sinais em δ_C 121,65 (carbono metínico) e δ_C 145,16 (carbono quaternário) no espectro de RMN de ¹³C (Fig.14) e no subspectro DEPT-135 (Fig. 15), indicaram que se tratava de um triterpeno pentacíclico da série oleanano, membro da classe Δ^{12} β-amirina (Mahato,1994). Os sinais em δ_C 80,51 e em δ_H 4,52 indicaram que este

esqueleto era funcionalizado no carbono C-3. Nestes espectros, também foi possível notar um sinal intenso relativo a grupos metilênicos (δ_C 29,42; δ_H 1,26), além dos sinais em δ_H 2,30 e δ_C 173,55, indicativos da presença de um éster de cadeia longa.

Também foram obtidos para RABEC-1 mapas de contornos HMQC e HMBC. Numa primeira análise do mapa de contornos HMBC (fig. 17) observou-se que o sinal de hidrogênio em δ_H 4,52 (característico de sinal de hidrogênio carbinólico no carbono C-3 de esqueleto oleanano) apresentava correlação com o sinal do carbono da carbonila (δ_C 173,55), bem como com os sinais de duas metilas (δ_C 16,78 (C-24) e δ_C 29,26 (C-23)). O sinal da carbonila, por sua vez, mostrou correlação com o sinal de hidrogênio em δ_H 2,30, sugerindo para RABEC-1 a estrutura de uma molécula de β -amirina ligada a um éster de cadeia longa.

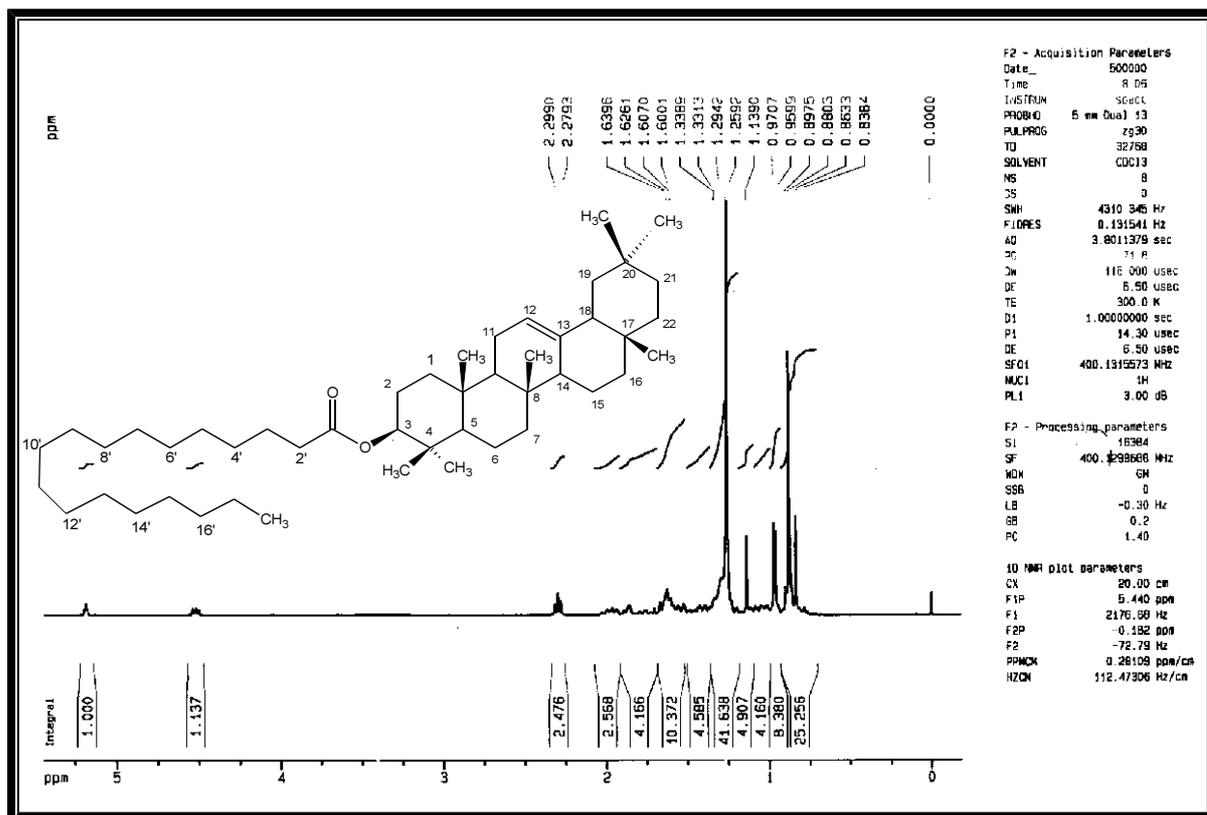


Figura 13- Espectro de RMN de ^1H de RABEC-1 (β -esteariloxi-olean-12-eno) CDCl_3 ; 400 MHz).

Uma vez que já se sabia tratar-se de um TTPC (30 carbonos) da classe β -amirina os 18 carbonos restantes só poderia pertencer ao éster de cadeia longa. Com base nestes dados, foi proposta para RABEC-1, a estrutura do β -esteariloxi-olean-12-eno.

O mapa de contornos HMQC de RABEC-1 permitiu confirmar as atribuições dos sinais dos carbonos C-3 (δ_C 80,51; δ_H 4,52), C-2' (δ_C 32,47; δ_H 2,28) e C-12 (δ_C 121,65; δ_H 5,20). Com estes valores de hidrogênios e de carbonos adotados como ponto de partida, procedeu-se, então, à análise do mapa de contornos HMBC a fim de se realizar a atribuição dos demais sinais de carbono e de hidrogênio da molécula.

O sinal de hidrogênio H-12 em δ_H 5,20 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 47,55 (C-9); δ_C 47,23 (C-18); δ_C 41,69 (C-14) e δ_C 22,69 (C-11). O sinal de carbono em δ_C 41,69 (C-14), mostrou correlação com o sinal de hidrogênio de grupos metila em δ_H 1,14 e em δ_H 0,97, que podem corresponder às metilas C-27 e C-26. O sinal de hidrogênio em δ_H 1,14 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 39,80 (C-8); δ_C 25,17 (C-15) e δ_C 145,16 (C-13), o que levou a concluir que esta metila só poderia ser a C-27 (δ_C 29,20, δ_H 1,14). Já o sinal dos hidrogênios em δ_H 0,97 mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 47,55 (C-9); δ_C 41,69 (C-14); δ_C 39,92 (C-8) e com δ_C 32,47 (C-7). Estes hidrogênios, portanto, pertencem à metila C-26 (δ_C 16,90; δ_H 0,97).

O sinal de carbono em δ_C 47,55 (C-9) mostrou, também, correlação com o sinal de hidrogênio da metila em δ_H 0,96 que deve ser a metila 25 (δ_C 15,54; δ_H 0,96). Esse sinal, por sua vez, está correlacionado com os sinais de carbono em δ_C 37,74 (C-1); δ_C 55,26 (C-5) e em δ_C 36,83 (C-10).

O sinal em δ_C 47,23 (C-18), o único CH até então não atribuído, mostrou correlação com o sinal de hidrogênio de metila em δ_H 0,84 o que permitiu concluir que esta seja a metila 28 (δ_C 29,26). Por sua vez, o sinal dos hidrogênios desta metila (δ_H 0,84) mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 32,47 (C-17); δ_C 29,37 (C-16) e em δ_C 37,70 (C-22).

O hidrogênio H-3 (δ_H 4,52) mostrou correlação com os sinais em δ_C 17,77 (C-24); δ_C 22,69 (C-2); δ_C 29,20 (C-23); δ_C 37,70 (C-4); δ_C 39,90 (C-1) e em δ_C 173,65 (C-1'). O hidrogênio H-2' (δ_H 2,30) mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 25,21 (C-3' ou C-4'); δ_C 29,28 (C-3' ou C-4') e em δ_C 173,55 (C-1')

Através da análise do mapa de contornos COSY (fig. 17), foi possível observar que o sinal de hidrogênio correspondente ao H-2' apresentou correlação com o sinal

de hidrogênio em δ_H 1,63 e que este pertence ao carbono com deslocamento químico em δ_C 25,17 e isto levou a conclusão que este corresponde ao carbono C-3'.

Pelo mapa de contornos HMQC observou-se que o sinal de hidrogênio em δ_H 0,88 correspondeu a cinco grupos metila: H-18', H-24, H-23, H-29 e H-30. Utilizando os dados da literatura para β -amirina confirmou-se os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-6 (δ_C 22,69), C-19 (δ_C 47,23), C-20 (δ_C 31,90), C-21 (δ_C 36,83), C-29 (δ_C 32,47) e C-30 (δ_C 23,75). Observou-se que o sinal de hidrogênio em δ_H 0,88 (C-18') mostrou correlação com os sinais de carbono em δ_C 22,69 e δ_C 31,93, que foram atribuídos aos carbonos C-17' e C-16', respectivamente.

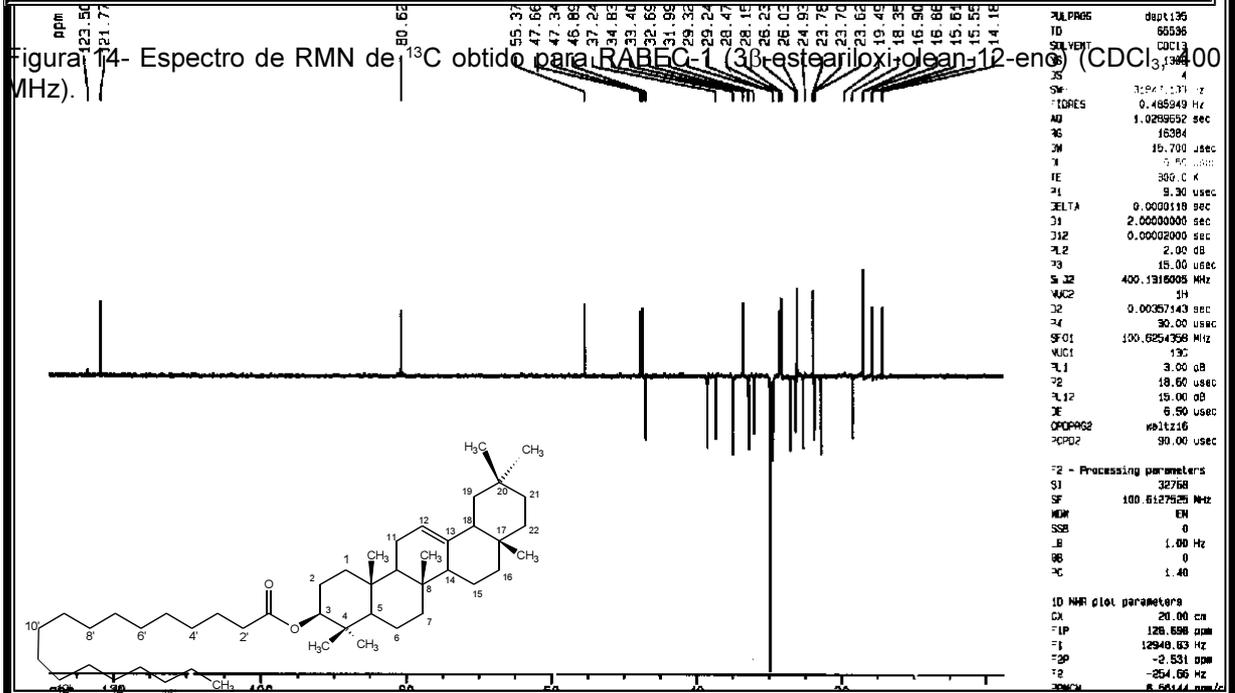
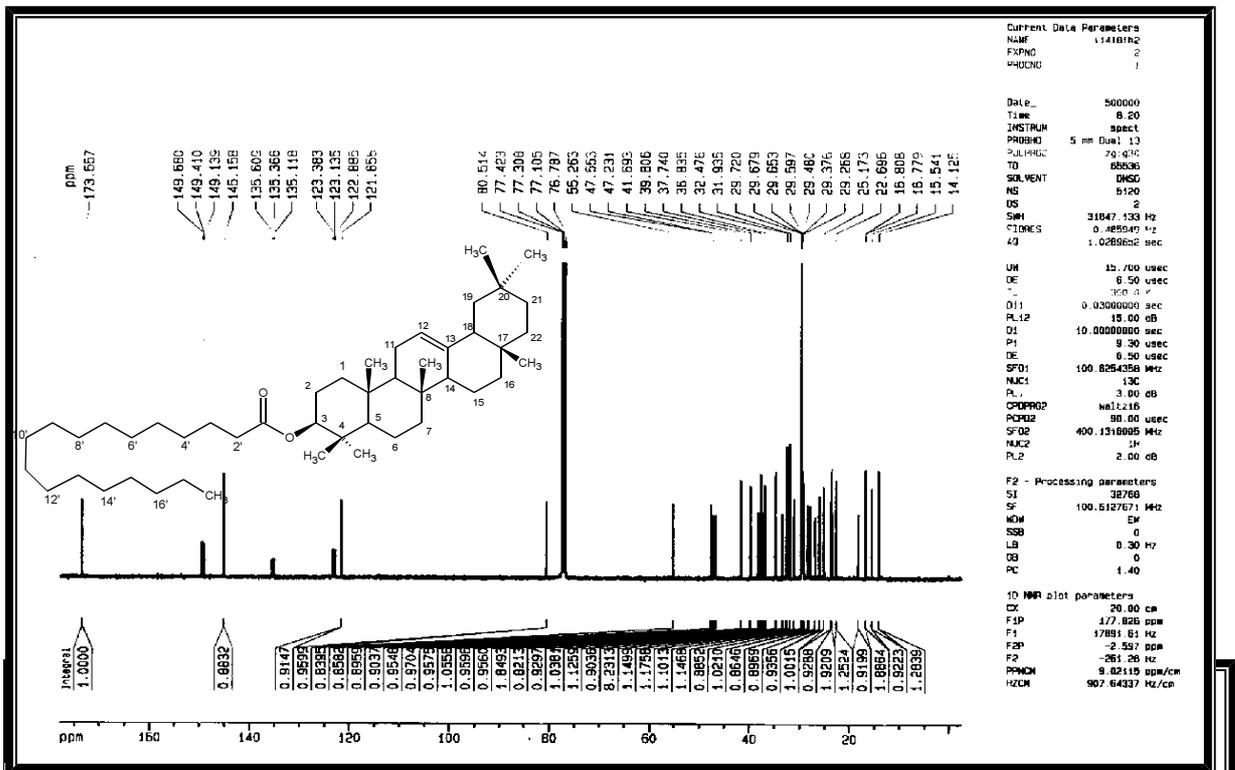


Figura 15- Espectro de DEPT-135 obtido para RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl₃, 400 MHz).

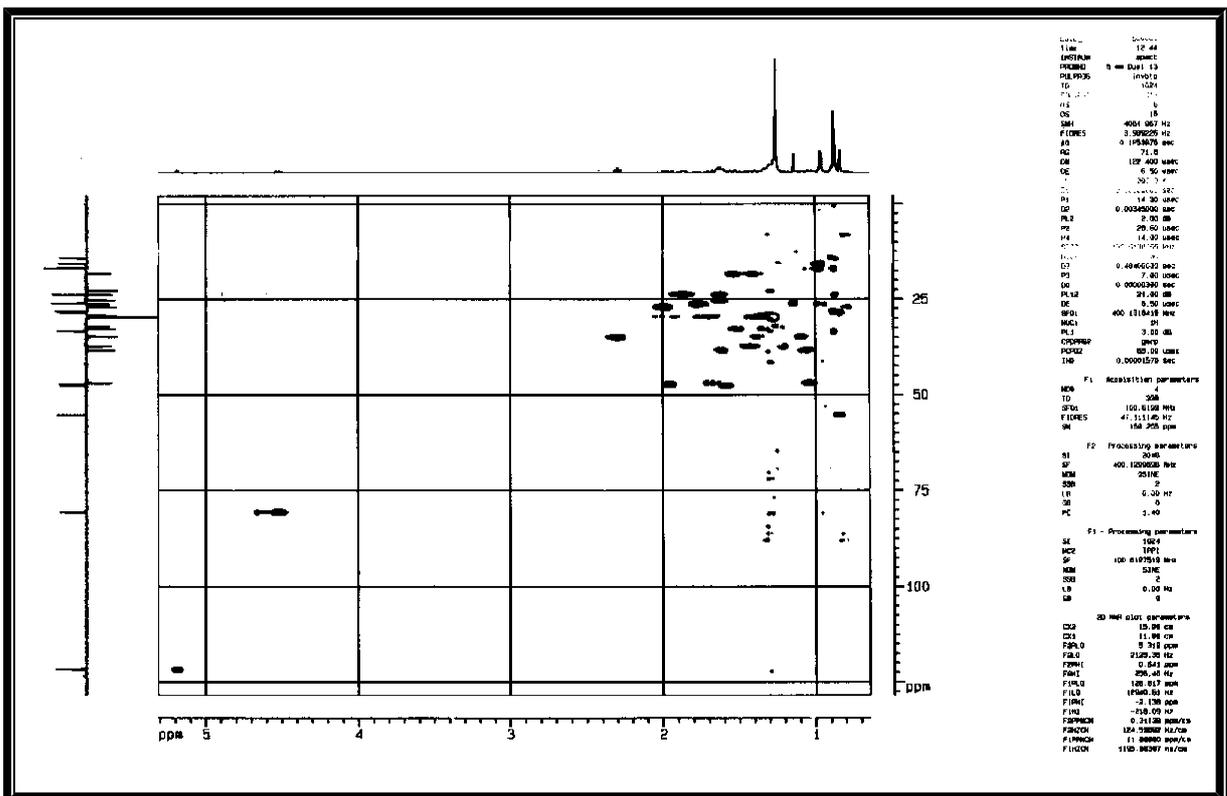


Figura 16- Mapa de contornos HMQC de RABEC-1 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl₃, 400 MHz).

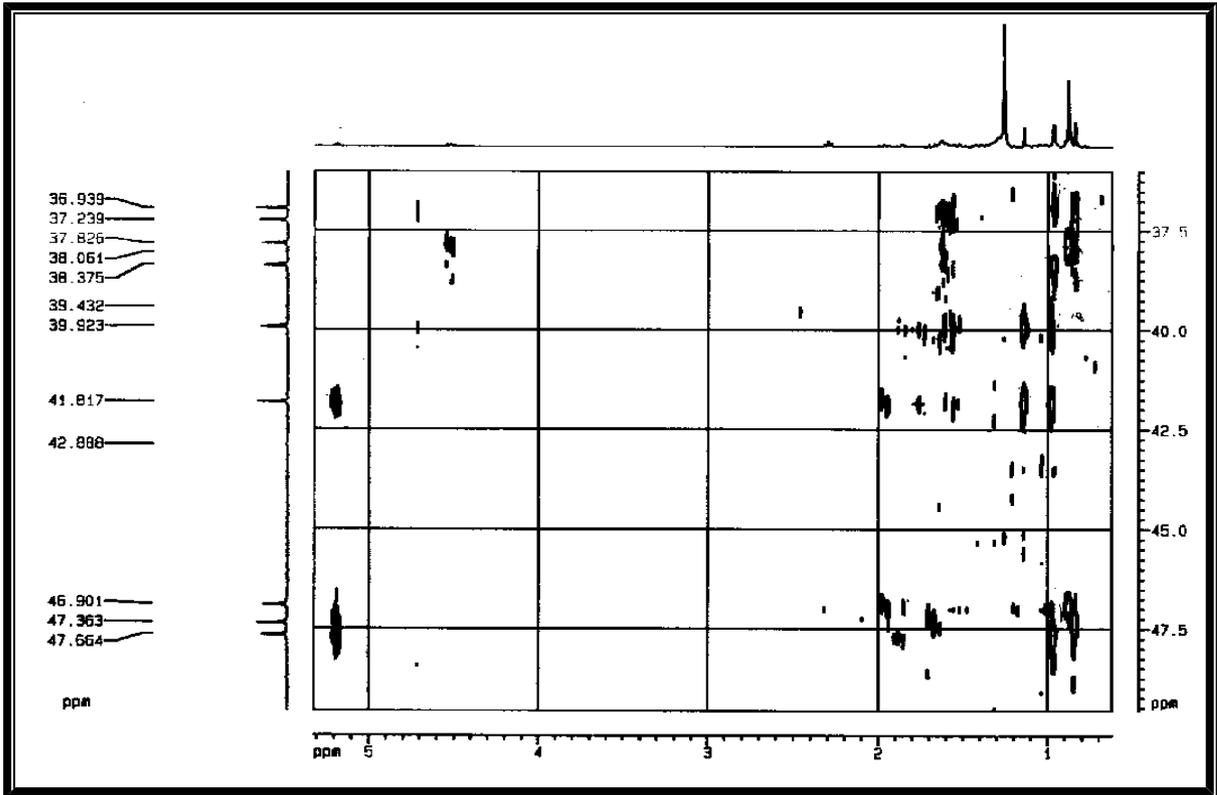


Figura 17- Mapa de contornos HMBC de RABEC-1 (3β -esteariloxi-olean-12-eno) (CDCl_3 , 400 MHz).

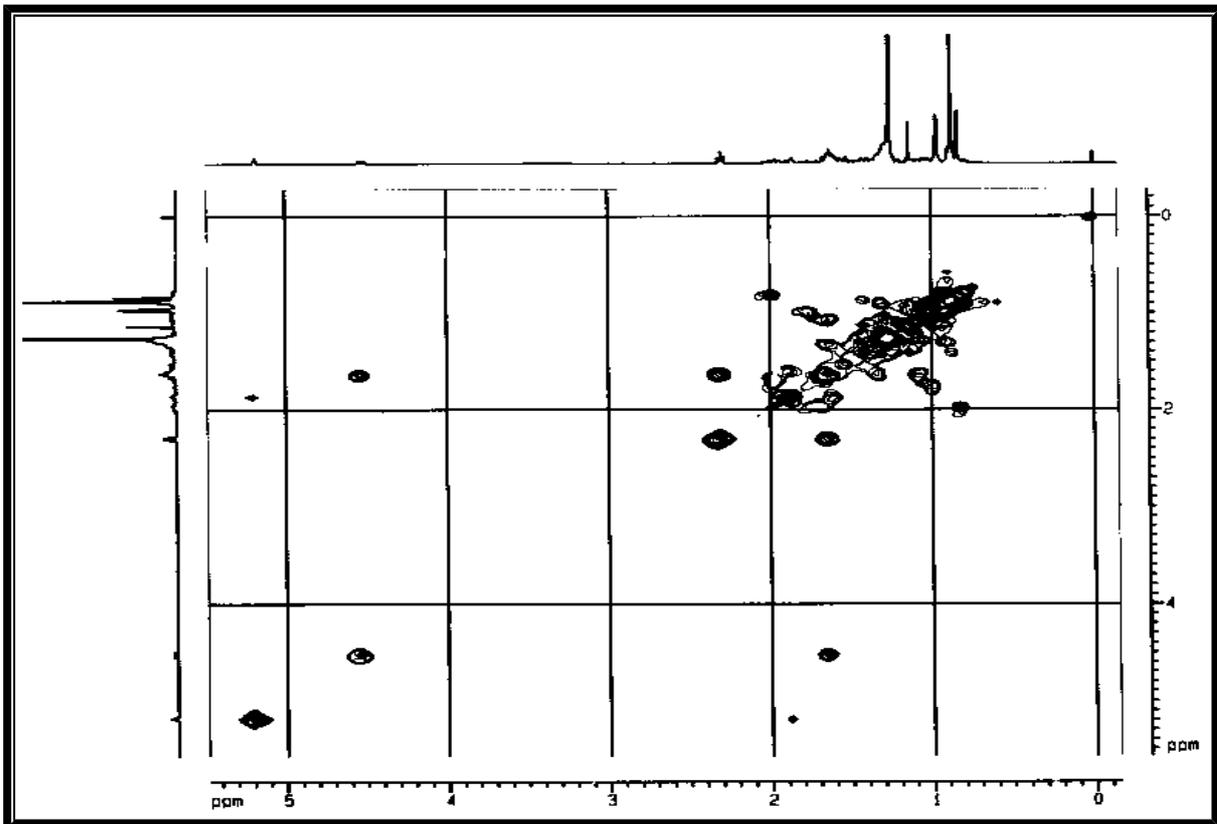


Figura 18- Mapa de contornos COSY de RABEC-1 (3β -esteariloxi-olean-12-eno), (CDCl_3 , 400MHz).

Através da análise do mapa de contornos NOESY (fig. 19), foi possível observar correlação entre H-18 com H-12, H-28 e H-30, correlação entre H-3 com H-2eq, H-1ax, H-23 e H-5, correlação entre H-11eq com H-1eq, H-25, correlação entre H-12 com H-11 e H-18 e também H-28 com H-15ax, H-22ax e H-22eq. Estas correlações confirmaram a estereoquímica da molécula. Os valores de deslocamentos químicos foram estabelecidos para todos os carbonos e hidrogênios da molécula, com a ajuda do mapa de contornos HMQC.

No quadro 2 estão compiladas as atribuições feitas para RABEC-1 utilizando RMN 1D e 2D, assim como os dados de RMN de ^{13}C disponíveis na literatura para a β -amirina (Pains Duarte, 2000). Para o estearato de metila, os dados de RMN de ^{13}C foram primeiramente calculados através do programa ACD-Labs e posteriormente atribuídos de acordo com a literatura (BENGSHI, 1986).

Pelos dados do quadro 1 pode-se observar que, os carbonos que apresentaram maior diferença de deslocamento químico em comparação com os da β -amirina, foram C-2, C-3, C-4 e C-24, obviamente devido a presença de um grupo tão volumoso no carbono 3. A partir dos resultados obtidos através dos métodos espectrométricos foi possível atribuir para RABEC-1 a estrutura do triterpeno 3β -esteariloxi-olean-12-eno.

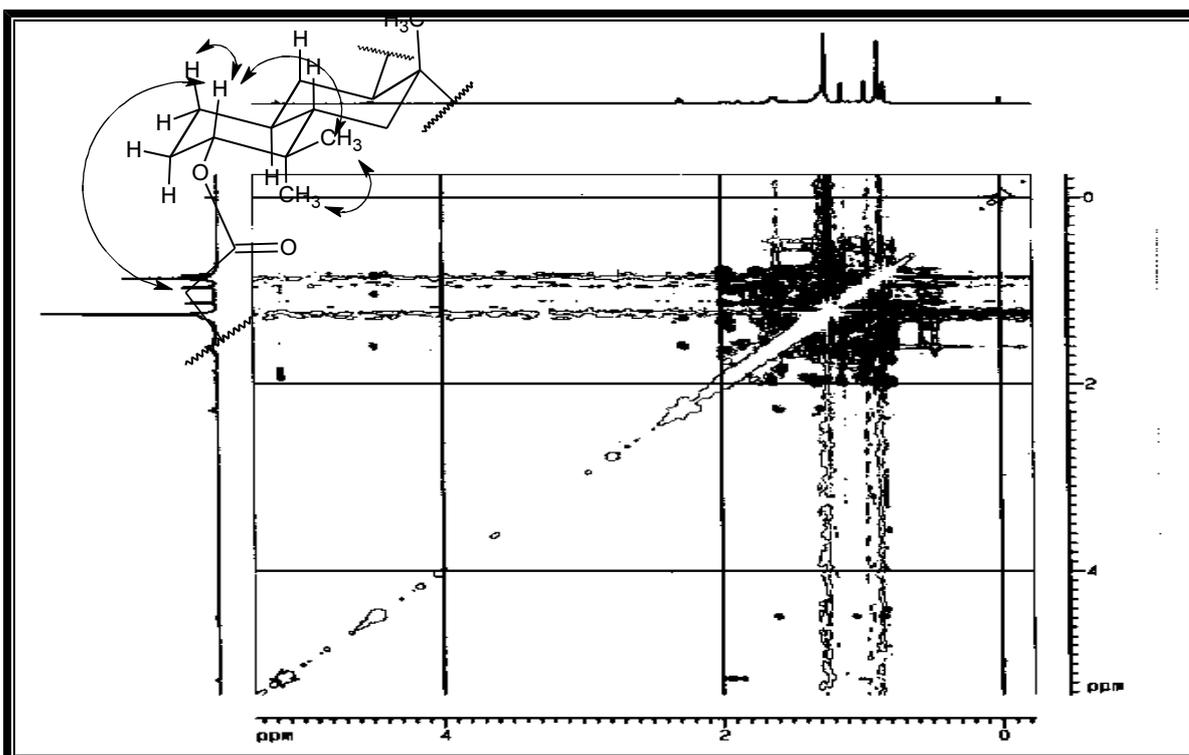


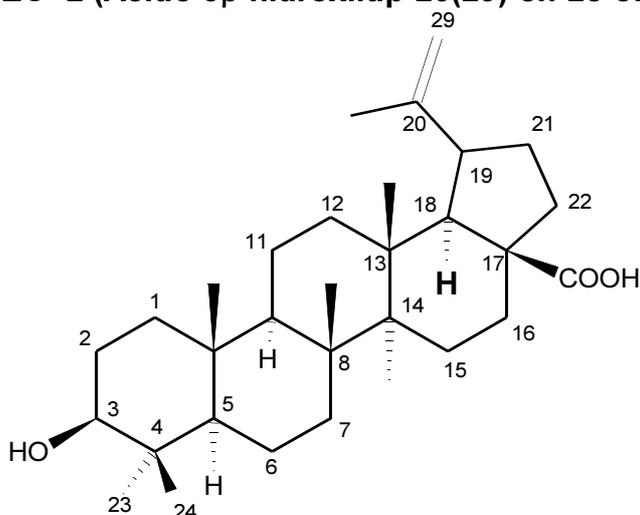
Figura 19- Mapa de contornos NOSEY de RABEC-1 (3β -esteariloxi-olean-12-eno), (CDCl_3 , 400 MHz).

Quadro 2- Deslocamentos Químicos (δ_c) de RMN ^{13}C e (δ_H) de RMN de 1H do 3 β -esteariloxi-olean-12-eno comparados com a literatura* *Mahato, 1994

| Carbo no número | β - amirina | RABEC-1 | δ_H | HMBC | Estear ato de metila | δ_c | RABEC-1 | δ_H | HMBC |
|-----------------------|----------------------|---------|-------------|--------------------|-------------------------------|------------|---------|------------|-----------------------|
| 1 | 38,60 | 37,74 | 1,13 e 1,61 | | 1' | - | 173,55 | - | |
| 2 | 26,95 | 22,69 | 1,64 | 3 | 2' | 34,20 | 34,87 | 2,30 | 1',3',4' |
| 3 | 79,05 | 80,51 | 4,52, | 1',1,2,4,23, 24 | 3' | 24,75 | 25,17 | 1,63 | |
| 4 | 38,80 | 36,83 | - | | 4' | 28,98 | 29,26 | 1,29 | |
| 5 | 55,18 | 55,26 | 0,80 | | 5' | 29,20 | 29,27 | 1,29 | |
| 6 | 18,39 | 18,35 | 1,43 e 1,56 | | 6' | 29,35 | 29,48 | 1,26 | |
| 7 | 32,66 | 32,47 | 1,36 e 1,52 | | 7' | 29,65 | 29,59 | 1,26 | |
| 8 | 39,80 | 41,51 | - | | 8' | 29,76 | 29,65 | 1,26 | |
| 9 | 47,65 | 47,55 | 1,60 | | 9' | 29,78 | 29,68 | 1,28 | |
| 10 | 36,96 | 36,94 | - | | 10' | 29,79 | 29,72 | 1,28 | |
| 11 | 23,55 | 23,61 | 1,86 | 12 | 11' | 29,80 | 29,72 | 1,26 | |
| 12 | 121,74 | 121,65 | 5,19; | 9,11,14,18 | 12' | 29,80 | 29,93 | 1,26 | |
| 13 | 145,22 | 145,16 | - | | 13' | 29,80 | 29,72 | 1,26 | |
| 14 | 41,73 | 41,69 | - | | 14' | 29,77 | 29,59 | 1,26 | |
| 15 | 26,17 | 26,24 | 0,96 | | 15' | 29,47 | 29,48 | 1,26 | |
| 16 | 27,25 | 27,04 | 2,20 | 28 | 16' | 32,04 | 31,93 | 1,26 | |
| 17 | 32,51 | 32,54 | - | | 17' | 22,80 | 22,69 | 1,26 | |
| 18 | 47,24 | 47,36 | 1,94 | 12 | 18' | 14,21 | 14,12 | 0,88 | 17', 16' |
| 19 | 46,84 | 46,90 | 1,03 e 1,76 | | | | | | |
| 20 | 31,11 | 31,10 | - | | | | | | |
| 21 | 34,75 | 34,83 | 1,10 e 1,39 | | | | | | |
| 22 | 37,15 | 37,24 | 1,22 e 1,46 | | | | | | |
| 23 | 28,11 | 28,13 | 0,88 | 3,4,5,24 | | | | | |
| Carbo no número | β - amirina | RABEC-1 | δ_H | HMBC | Estear ato de metila | δ_c | RABEC-1 | δ_H | Carbon o número |
| 24 | 15,60 | 16,82 | 0,88 | 3,4,5,23 | | | | | |
| 25 | 15,52 | 15,57 | 0,96 | 1, 5, 9, 10 | | | | | |
| 26 | 16,82 | 16,90 | 0,97 | 7,8,9,14 | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|----|-------|-------|------|-----------------|--|--|--|--|--|
| 27 | 26,01 | 26,00 | 1,14 | 8,13,14,15 | | | | | |
| 28 | 28,42 | 28,43 | 0,84 | 16,17,18,2 2 | | | | | |
| 29 | 33,36 | 33,35 | 0,88 | 19,20,21,3 0 | | | | | |
| 30 | 23,71 | 23,75 | 0,88 | 19,20,21,2 9 | | | | | |

RABEC -2 (Ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico)



$C_{30}H_{48}O_3$ e PM: 456g/mol
Tf: 285-290°C
FORMA: Cristais Brancos

A substância RABEC-2 mostrou-se como sólido branco com ponto de fusão 285-290°C e em teste de LB apresentou resultado positivo para triterpeno pentacíclico. O espectro de absorção na região do IV (fig. 20) de RABEC-2 mostrou bandas de absorção em 2918 cm^{-1} referente à deformação axial C-H, em 3435 cm^{-1} , característica de estiramento de O-H e bandas de absorção em 1732,64 referente ao estiramento C=O. O perfil do espectro em 3435 cm^{-1} , aliada a presença de carbonila, sugeriu tratar de um ácido carboxílico. Observou ainda em 1634 cm^{-1} banda de absorção devido ao estiramento axial de C=C.

Devido ao grande número de hidrogênios ligados a carbonos sp^3 , característicos dos terpenos, o RMN de 1H torna-se bastante complexo na região 0,8 a 1,6 ppm e, portanto pouco elucidativo. Mesmo assim, o espectro de RMN de 1H e COSY de RABEC-2 (fig.21) mostrou os sinais característicos para os hidrogênios de metilas com simpletos $\delta_H=0,82$; 0,97; 0,99; 1,26; 1,28; 1,71 (5H, δ_H -25, H-26, H-27,

H-23, H-30) e os hidrogênios metilênicos do sistema triterpênico do tipo $\Delta^{20(29)}$ δ_{H} : 4,77 (1H, δ ,H-29) e 5,06(1H, δ ,H-20) e δ_{H} : 3,23 para H-3.

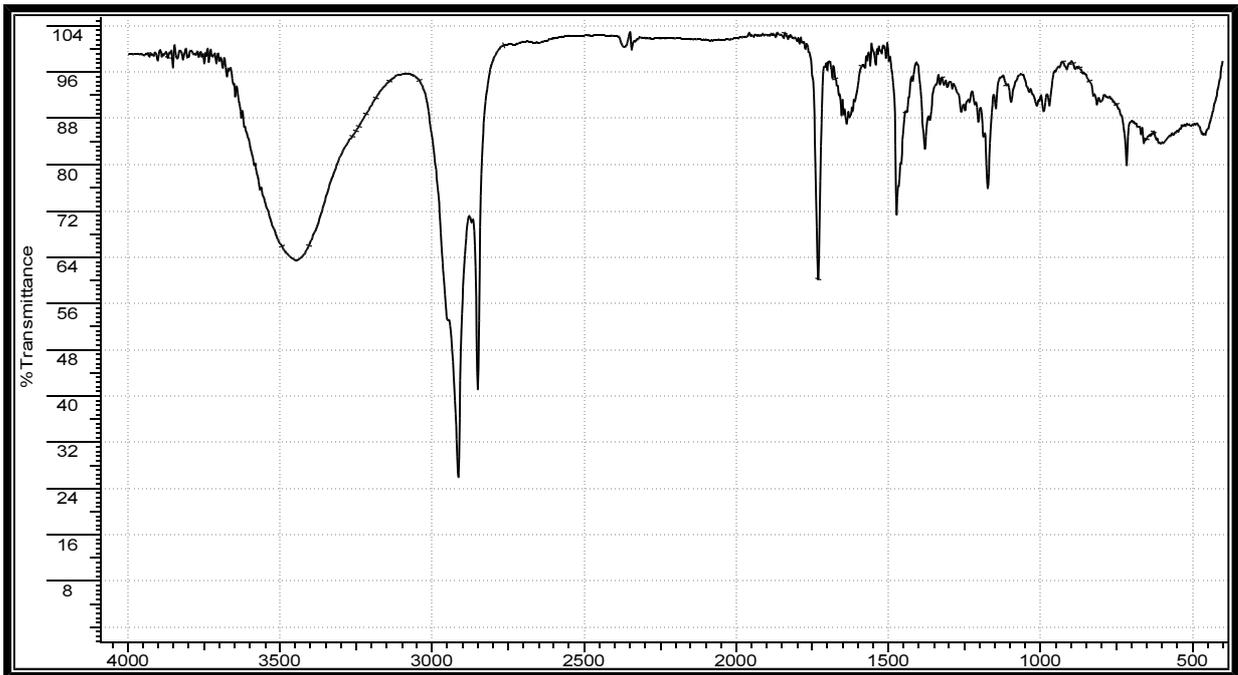


Figura 20- Espectro no IV para o ácido 3 β -hidroxilup-20(29)-en-28-óico (KBr, cm⁻¹).

No espectro de RMN de ¹³C (fig. 22), observou-se os sinais de carbono sp³ na região em δ_{C} 14,70 a 56,33; os sinais característicos a Δ (20/29) em δ_{C} 109,35 e 151,07 respectivamente, carbono carboxílico em δ_{C} 179,15(C-28) e o carbono metínico em δ_{C} 78,57. O espectro de RMN de ¹³C em análise conjunta com o espectro DEPT-135, confirma a presença de 6 carbonos metílicos, 11 carbonos

metilênicos, 6 metínicos e 7 carbonos desidrogenados, sendo 6sp inseridos no esqueleto carbônico e um carboxílico, perfazendo um total de 30 carbonos. Verificou-se ainda a ligação dupla terminal em δ_{C} 109,35/C-29.

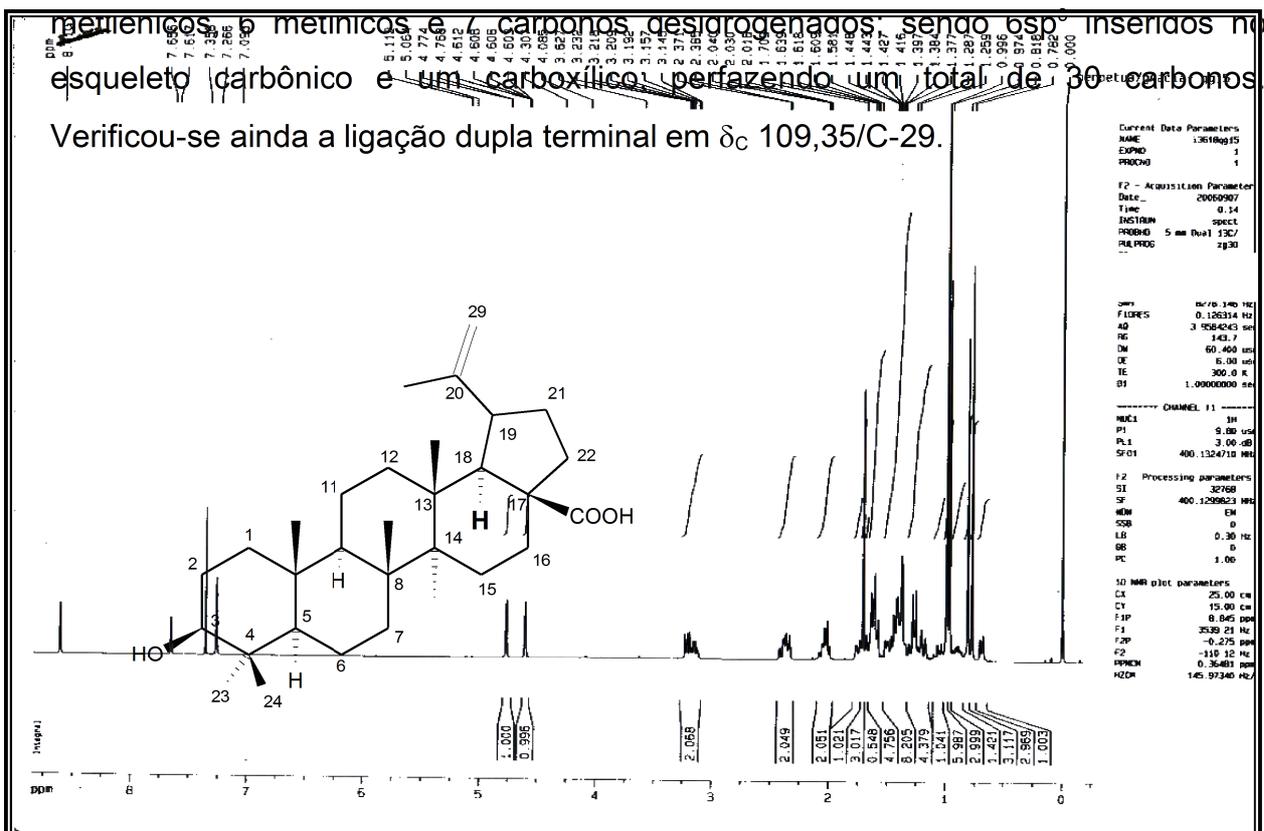


Figura 21- Espectro de RMN de ^1H de RABEC-2 (CDCl_3 , 400MHz).

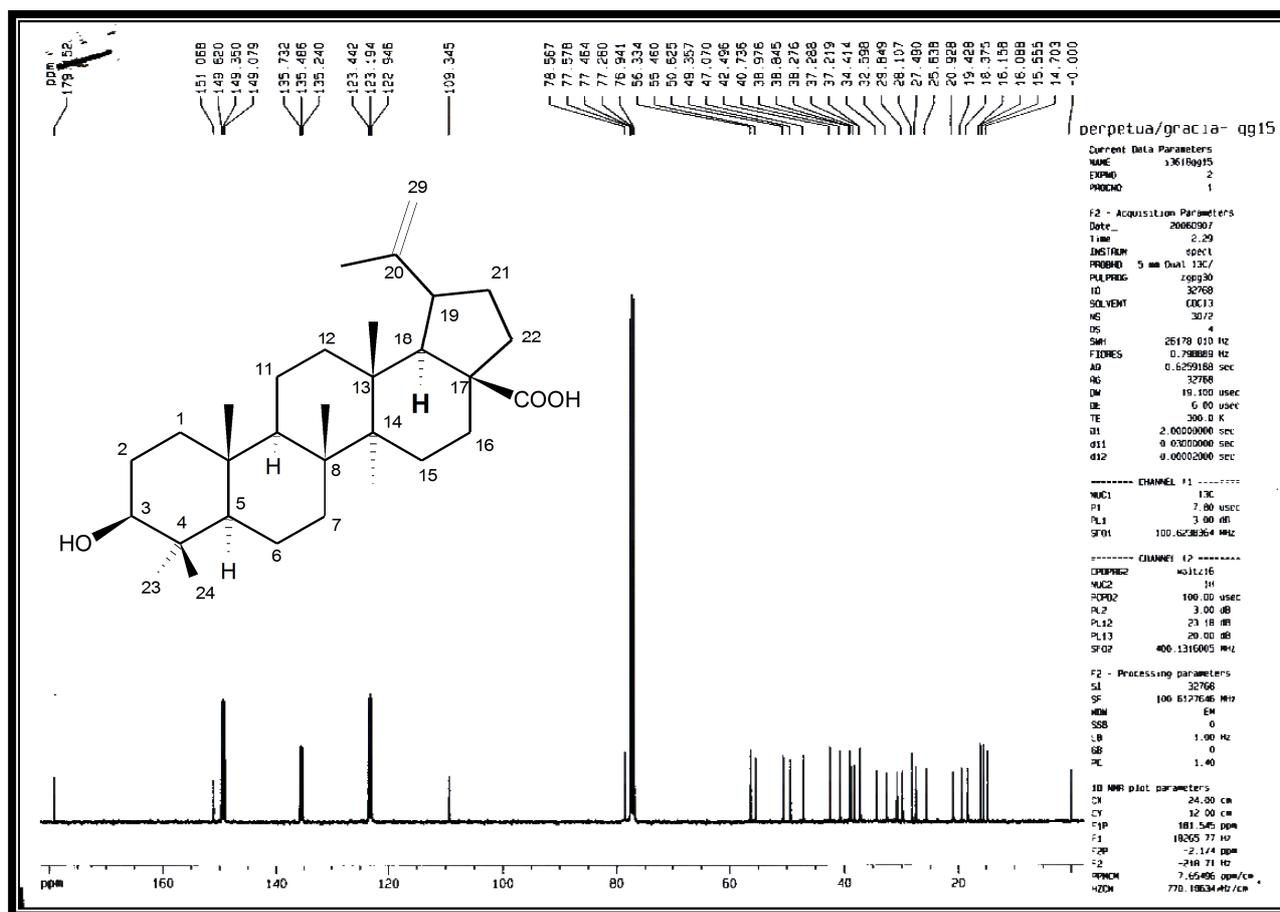


Figura 22- Espectro de RMN de ^{13}C de RABEC-2 (CDCl_3 , 400 MHz).

Baseando-se na comparação entre os dados de deslocamento químico dos carbonos observados no espectro de RMN de ^{13}C e no espectro DEPT-135 (fig. 23) com os dados na literatura (McLEAN,1987), foi possível sugerir para RABEC-2 a estrutura do Ácido 3 β -hidroxilup-20 (29)-en-28-óico). Pode-se observar através do COSY e HMQC a conectividade entre δc : 70,90 (C-3) e δH : 4,07 (1H); s caracterizando a hidroxilação de um CH_2 do anel lupano.

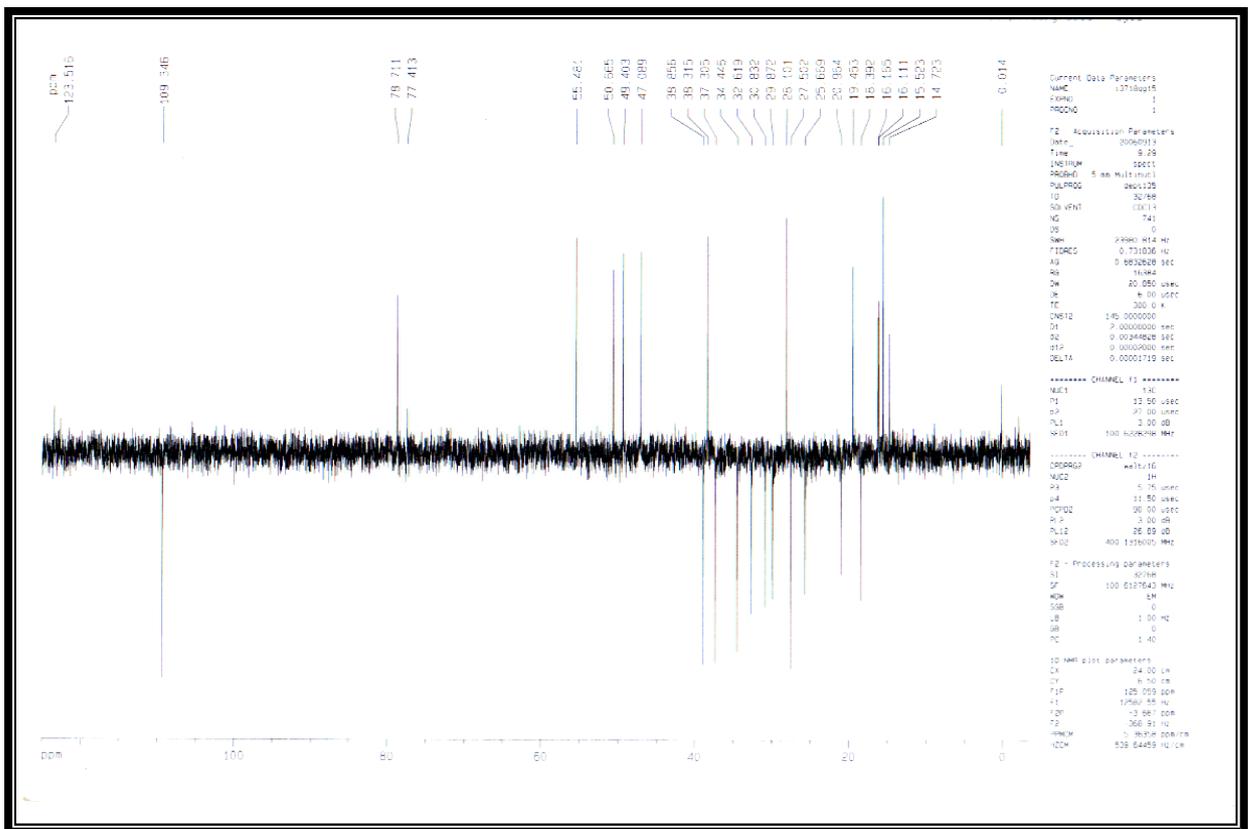
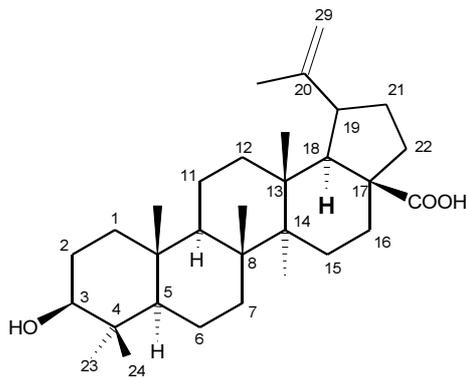


Figura 23- Espectro de DEPT 135 de RABEC-2 (ácido 3 β -hidroxilup-20 (29)-en-28-óico) (CDCl₃, 400MHz).

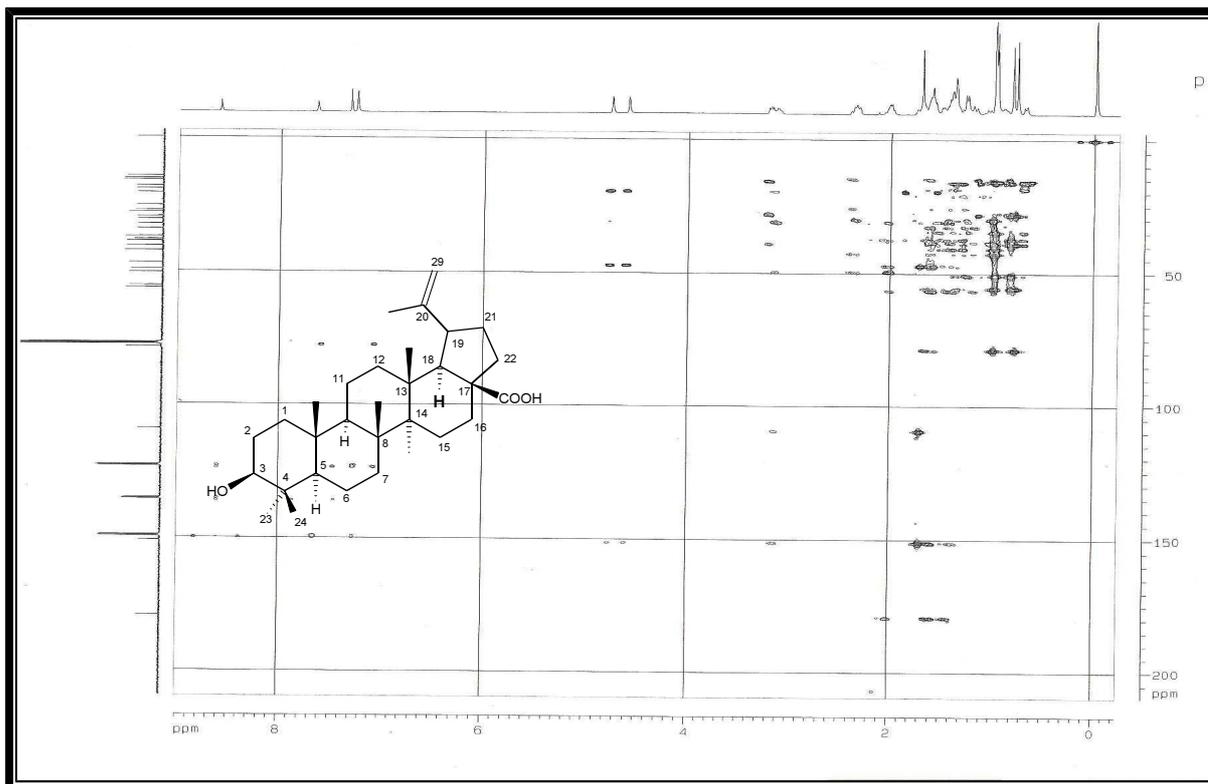


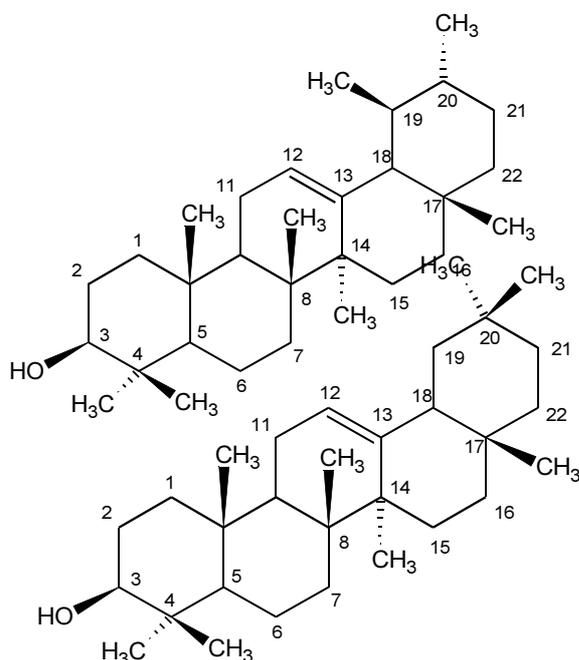
Figura 26- Mapa de contornos HMBC de Rabec-2 (ácido betulínico), (CDCl_3 , 400 MHz).

Quadro 3- Deslocamentos químicos (δ_c) de RMN ^{13}C do ácido betulínico comparados com a literatura". Mahato, 1994

| Carbono número | Ácido Betulínico | RABEC-2 | Carbono número | Acido Betulínico | RABEC-2 |
|----------------|------------------|---------|----------------|------------------|---------|
| 1 | 38,7 | 38,71 | 16 | 35,5 | 35,58 |
| 2 | 27,4 | 27,44 | 17 | 43,0 | 42,00 |
| 3 | 78,9 | 79,24 | 18 | 48,2 | 48,30 |
| 4 | 38,8 | 38,86 | 19 | 47,9 | 47,98 |
| 5 | 55,3 | 55,29 | 20 | 150,9 | 151,21 |
| 6 | 18,3 | 18,32 | 21 | 29,8 | 29,84 |
| 7 | 34,2 | 34,28 | 22 | 40,0 | 40,00 |
| 8 | 40,8 | 40,83 | 23 | 28,0 | 27,99 |
| 9 | 50,4 | 50,43 | 24 | 15,4 | 15,37 |
| Carbono número | Ácido Betulínico | RABEC-2 | Carbono número | Acido Betulínico | RABEC-2 |
| 10 | 37,1 | 37,17 | 25 | 16,1 | 16,12 |
| 11 | 20,9 | 20,91 | 26 | 15,9 | 15,98 |

| | | | | | |
|----|------|-------|----|-------|--------|
| 12 | 25,1 | 25,14 | 27 | 14,5 | 14,55 |
| 13 | 38,0 | 38,05 | 28 | 18,0 | 18,00 |
| 14 | 42,8 | 42,83 | 29 | 109,3 | 109,55 |
| 15 | 27,4 | 27,41 | 30 | 19,3 | 19,31 |

RABEC-3 (Misturas de α e β - amirina)



α e β - amirina

Sólido branco e amorfo
Tf: 173-180 °C
Fórmula Molecular:
C₃₀H₅₀O

A substância RABEC-3 apresentou-se como um sólido branco amorfo. A mesma foi submetida ao teste de Liebermann-Buchard que apresentou uma coloração róseo característico de triterpenos pentacíclicos. Quando comparado com padrões autênticos de mistura de α -amirina e β -amirina presentes no LFQM, apresentou-se com o mesmo Rf. A hipótese de que a substância isolada seria também uma mistura desses triterpenos foi confirmada com a determinação da temperatura de fusão e comparação do espectro obtido na região do Infravermelho,

que apresentou valores bem próximos do padrão e de valores encontrados na literatura.

Pela análise do espectro obtido na região do IV, (fig. 27), ficou evidenciada a natureza alicíclica de RABEC-4 através das bandas de absorção em 2920-2850 cm^{-1} e em 1450 cm^{-1} (fig. 28). Observou-se ainda a presença de bandas de absorção em 3450-3300 cm^{-1} e em 1100 cm^{-1} , característicos de grupos hidroxila. As bandas em 1640 e em 830 cm^{-1} , indicam a presença de grupo olefínico tri-substituído.

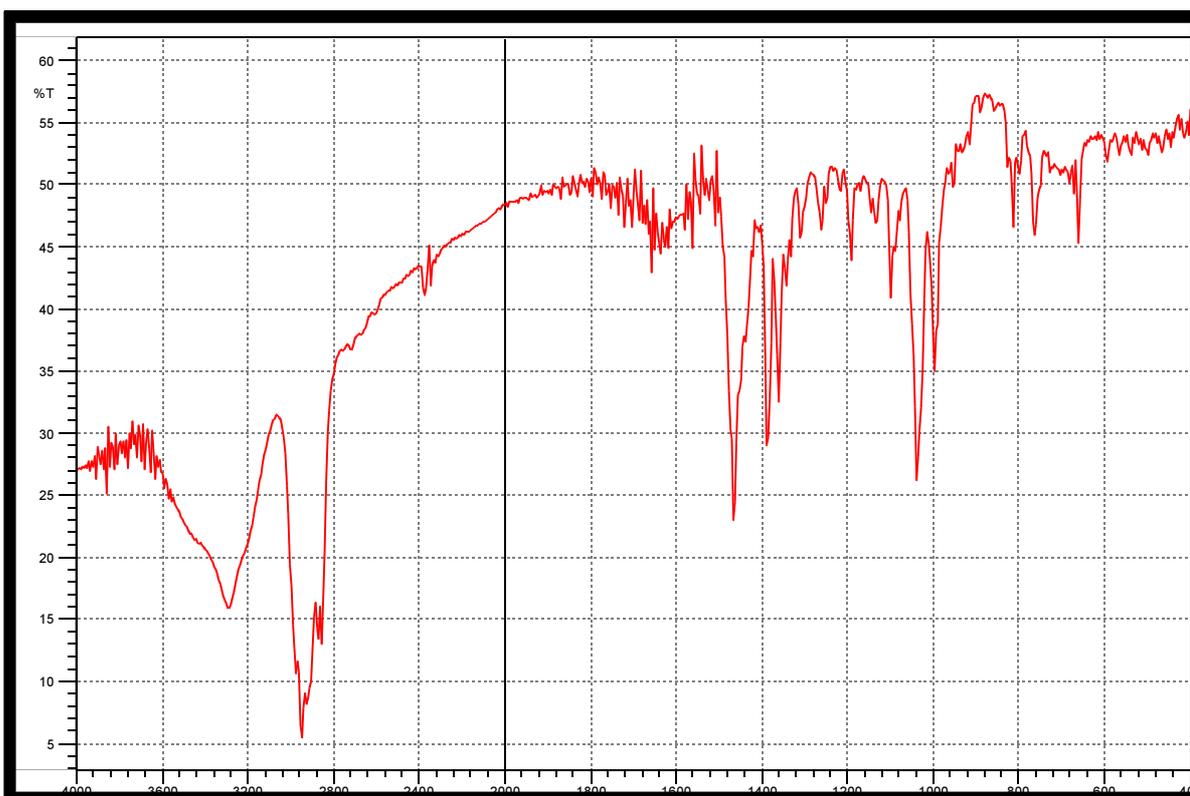
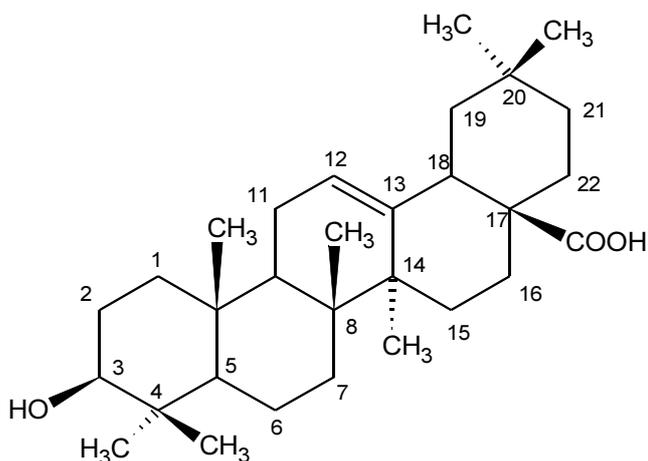


Figura 27- Espectro de RABEC-3 (mistura de α -amirina e β -amirina), obtido na região do infravermelho (KBr, cm^{-1}).

RABEC- 4 (ácido oleanólico)



Sólido branco e amorfo
Tf: 284-288 °C
Fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$
Massa Molecular: 456,36

RABEC-4 no teste de Lieberman-Burchard apresentou coloração rósea, sugerindo a presença de esqueleto triterpênico. O espectro de absorção na região do IV de RABEC-2 mostrou banda de absorção em 2944 cm^{-1} referente á deformação axial C-H, em 3490 cm^{-1} , característica de estiramento O-H e bandas de absorção em 1720 referente ao estiramento C=O. O perfil do espectro em 3490 cm^{-1} , aliada a presença de carbonila, sugeriu tratar de um ácido carboxílico. Observou ainda em 1643 cm^{-1} banda de absorção devido ao estiramento axial de C=C.

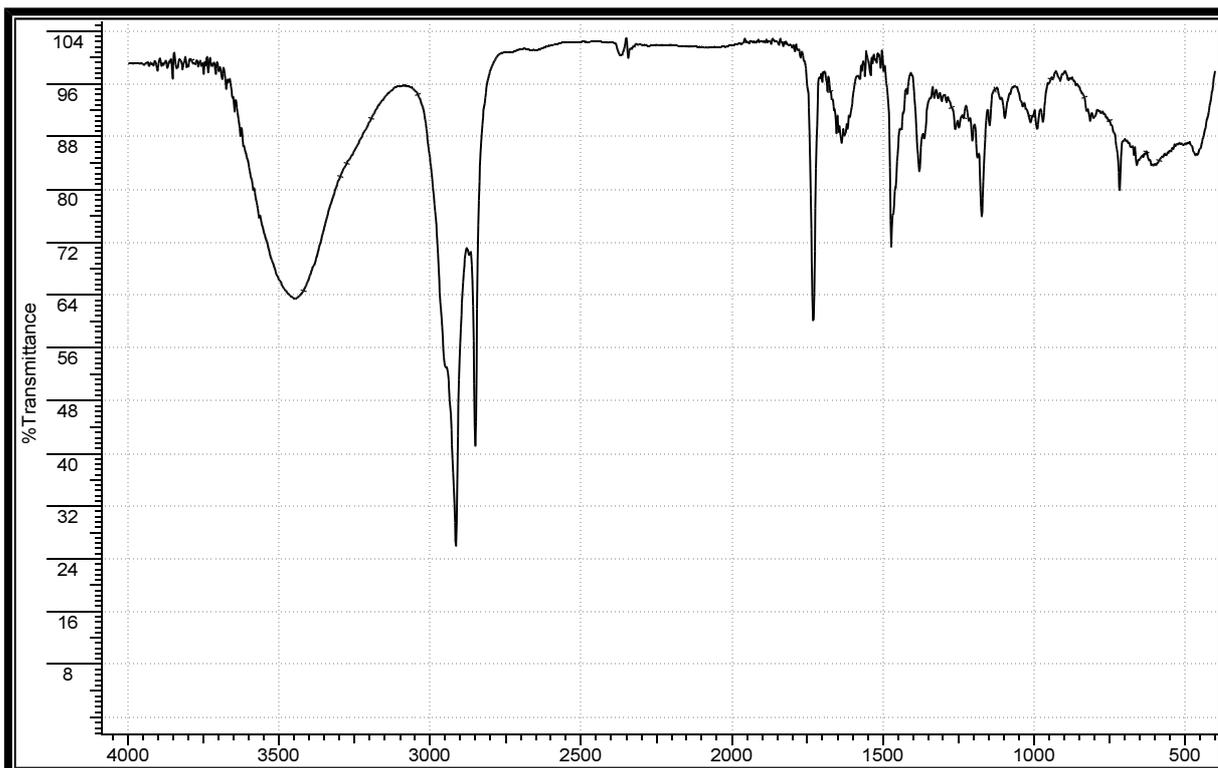


Figura 28- Espectro no IV para o RABEC-4 (áido oleanólico) (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (fig. 29), de RABEC-4, apresentou 7 sinais de singletos na região mais blindada entre 0,47 e 1,23 correspondentes a metilas. Em $\delta_{\text{H}} 3,38$ mostrou um sinal relativo ao ^1H carbinólico ligado ao C-3. O H olefínico ligado ao C-12 é mostrado como um sigleto largo em $\delta_{\text{H}} 5,25$.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 29), totalmente desacoplado de RABEC-4, mostrou deslocamentos químicos δ_{C} 144,01 e 121, 57 dos carbonos da ligação dupla C12/C13 respectivamente característica dos esqueletos oleânânicos. Apresentou um deslocamento químico em δ_{C} 181,64 correspondente ao carbono da carbonila ácida e o carbono metínico em δ_{C} em 79,15. Baseando-se na comparação entre os dados de deslocamentos químicos dos carbonos observados no espectro de RMN de ^{13}C

com os dados da literatura (quadro 3), confirmou-se a estrutura de RABEC-4 como sendo o ácido oleanólico

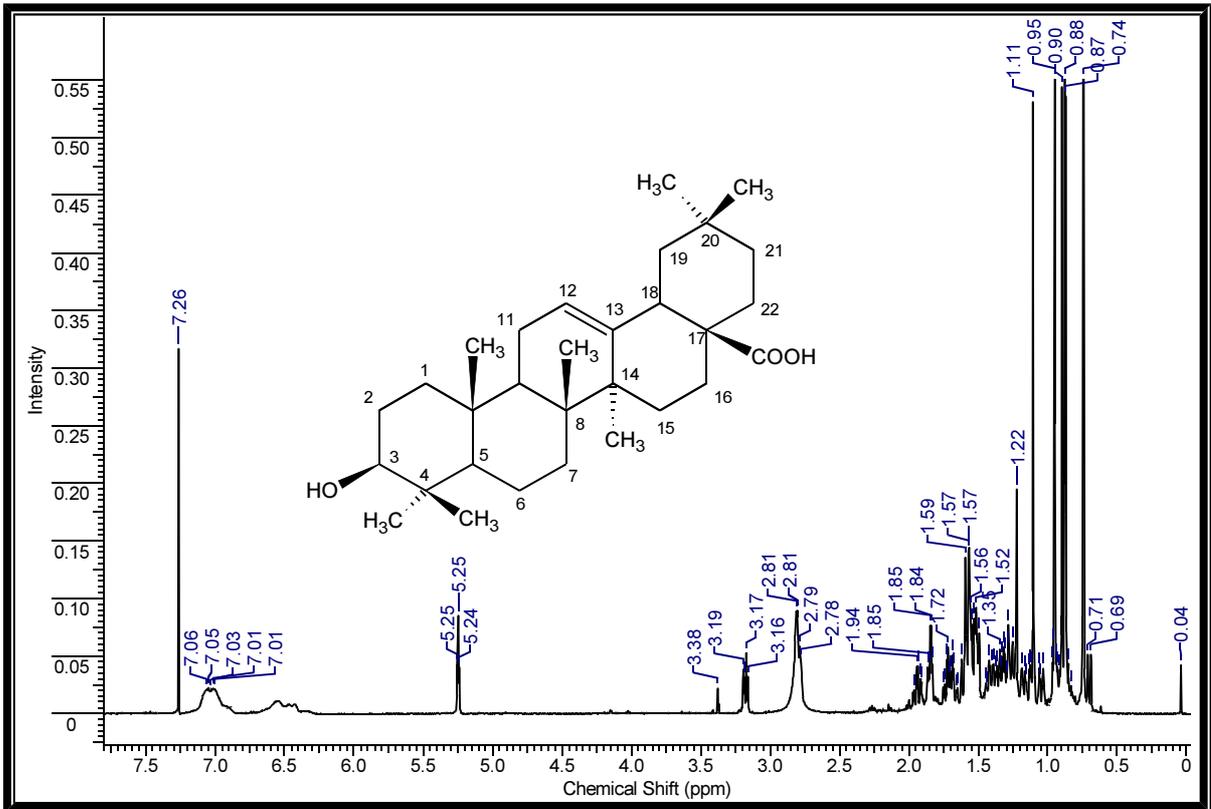


Figura 29- Espectro de RMN de ^1H de RABEC-4 (ácido oleanólico) (CDCl_3 , 500 MHz)

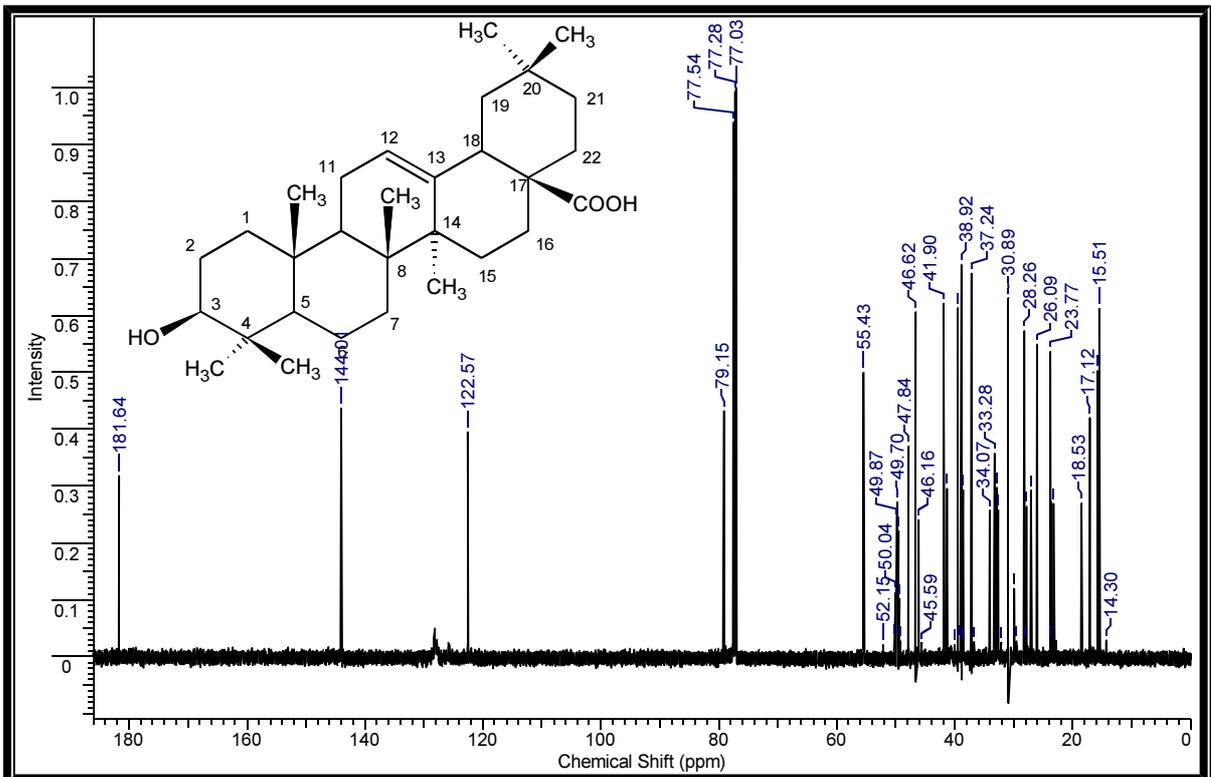


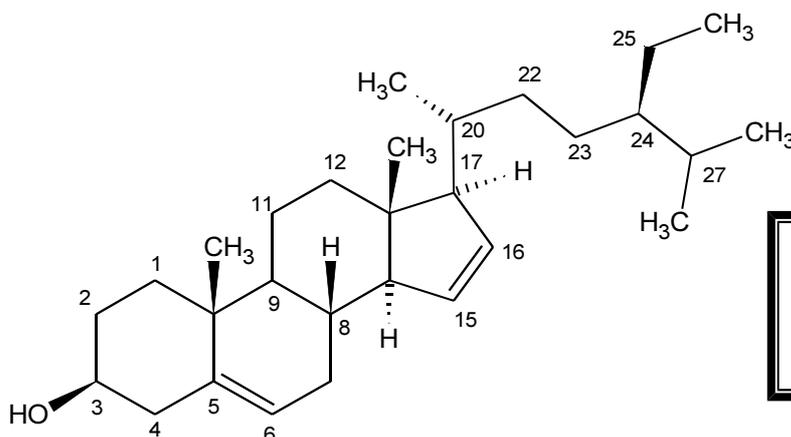
Figura 30- Espectro de RMN de ^{13}C de RABEC-4 (Ácido oleanólico) (CDCl_3 , 500 MHz)

Quadro 4- Deslocamentos químicos (δ_c) de RMN ^{13}C do ácido oleanólico comparados com a literatura*.

*Mahato, 1994

| Carbono número | Ácido oleanólico | RABEC-4 | Carbono número | Ácido oleanólico | RABEC-4 |
|----------------|------------------|---------|----------------|------------------|---------|
| 1 | 38,7 | 38,8 | 16 | 27,0 | 37,3 |
| 2 | 27,3 | 27,5 | 17 | 32,5 | 32,2 |
| 3 | 79,0 | 79,1 | 18 | 47,4 | 47,8 |
| 4 | 38,8 | 38,9 | 19 | 46,9 | 46,6 |
| 5 | 55,3 | 55,4 | 20 | 31,1 | 30,9 |
| 6 | 18,5 | 18,5 | 21 | 34,8 | 34,1 |
| 7 | 32,8 | 32,9 | 22 | 38,2 | 38,9 |
| 8 | 38,3 | 38,5 | 23 | 28,2 | 28,3 |
| 9 | 47,7 | 47,8 | 24 | 15,5 | 15,5 |
| 10 | 37,6 | 37,2 | 25 | 15,6 | 15,7 |
| 11 | 23,6 | 23,7 | 26 | 16,9 | 17,1 |
| 12 | 121,8 | 122,5 | 27 | 26,0 | 26,1 |
| 13 | 145,1 | 144,1 | 28 | 28,4 | 28,3 |
| 14 | 41,8 | 41,9 | 29 | 33,3 | 33,3 |
| 15 | 26,2 | 26,1 | 30 | 23,7 | 23,8 |

RABEC-5 (β -sitosterol)



Sólido branco amorfo
Tf: 124 -129 °C
Fórmula molecular C₂₉H₄₈O
Massa Molecular 412 g/mol

RABEC-5 foi obtido do extrato clorofórmico das raízes de *Arrabidaea brachypoda* e apresentou-se como um sólido branco e quando submetido ao teste de Liebermann- Burchard apresentou coloração azul, passando a verde, resultado característico de compostos esteróidais. Este resultado sugeriu que RABEC-5 poderia se o β -sitosterol, um esteróide comumente encontrado em várias espécies de plantas do cerrado. O espectro de absorção na região do IV (Fig. 31) apresenta

bandas de absorção em 2935 e 2862 cm^{-1} , atribuída ao estiramento de C-H e em 1462 e 1376 cm^{-1} , atribuídas à deformação angular de grupos metílicos e metilênicos evidenciando a natureza alifática de RABEC-5. Observa-se também uma banda larga em 3422 cm^{-1} característica de estiramento de O-H de hidroxil de álcool, e observações em 1048 e 1018 cm^{-1} , atribuído a estiramento de C-O de alcoóis. (Silverstein et al., 1998).

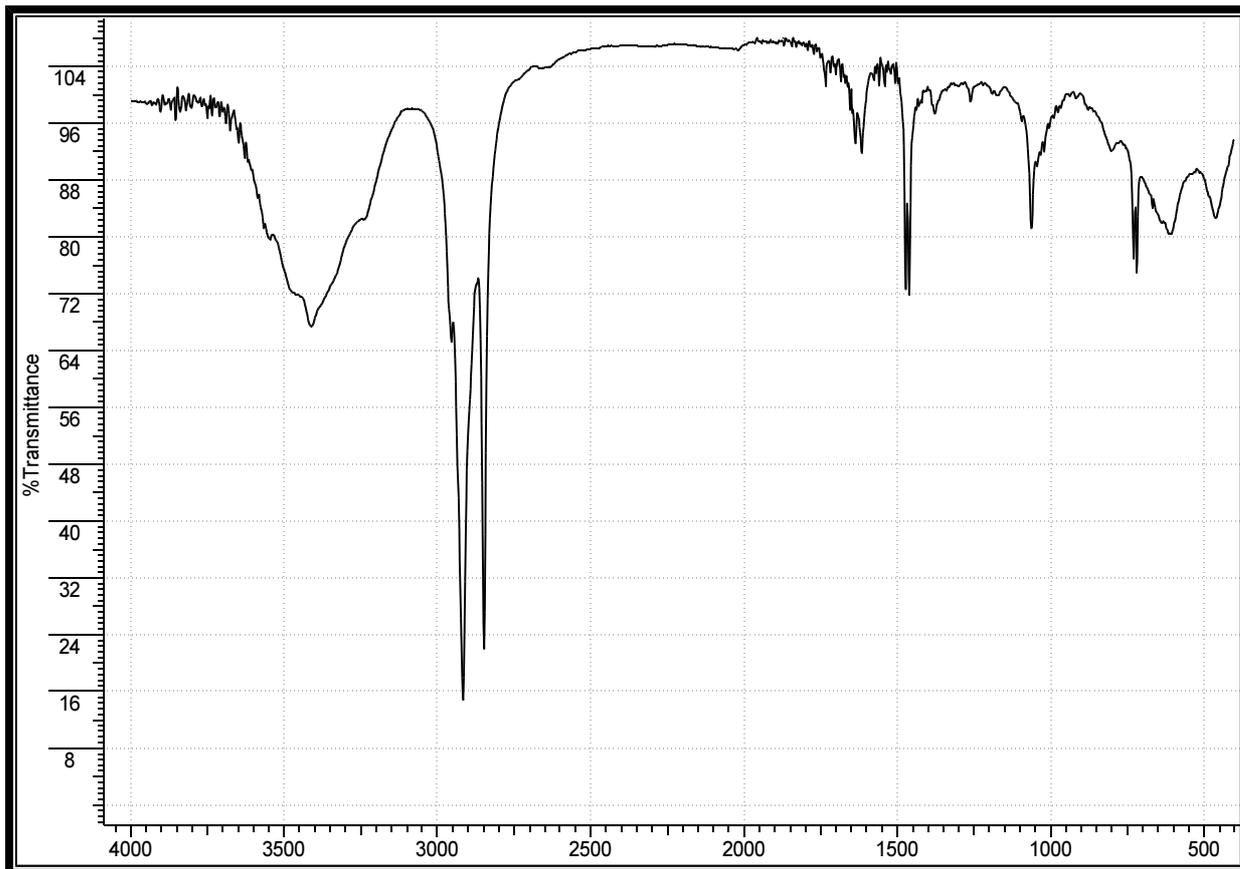


Figura 31- Espectro no IV DE RABEC-5 (β -sitosterol) (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 32) apresenta sinais múltiplos na região entre δ_{H} 0,68 e 2,29, sendo estes atribuídos a hidrogênios metínicos, metilênicos e metílicos. O sinal em δ_{H} 3,52 foi atribuído aos hidrogênios carbinólicos H3 e o sinal em δ_{H} 5,35 foi atribuído ao hidrogênio olefínico H6.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 33) mostrou a presença de 28 sinais. Os sinais em δ_{C} 121,95 (CH) e 140,98 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C6 e C5 respectivamente e sinal em δ_{C} 72,04 (CH) foi atribuído a C3. A confirmação estrutural e a atribuição dos demais sinais de carbono deu-se por comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de RABEC-5 em comparação com dados

da literatura. Os valores dos deslocamentos químicos para RABEC-4 e aqueles descritos na literatura estão relacionados no quadro 5.

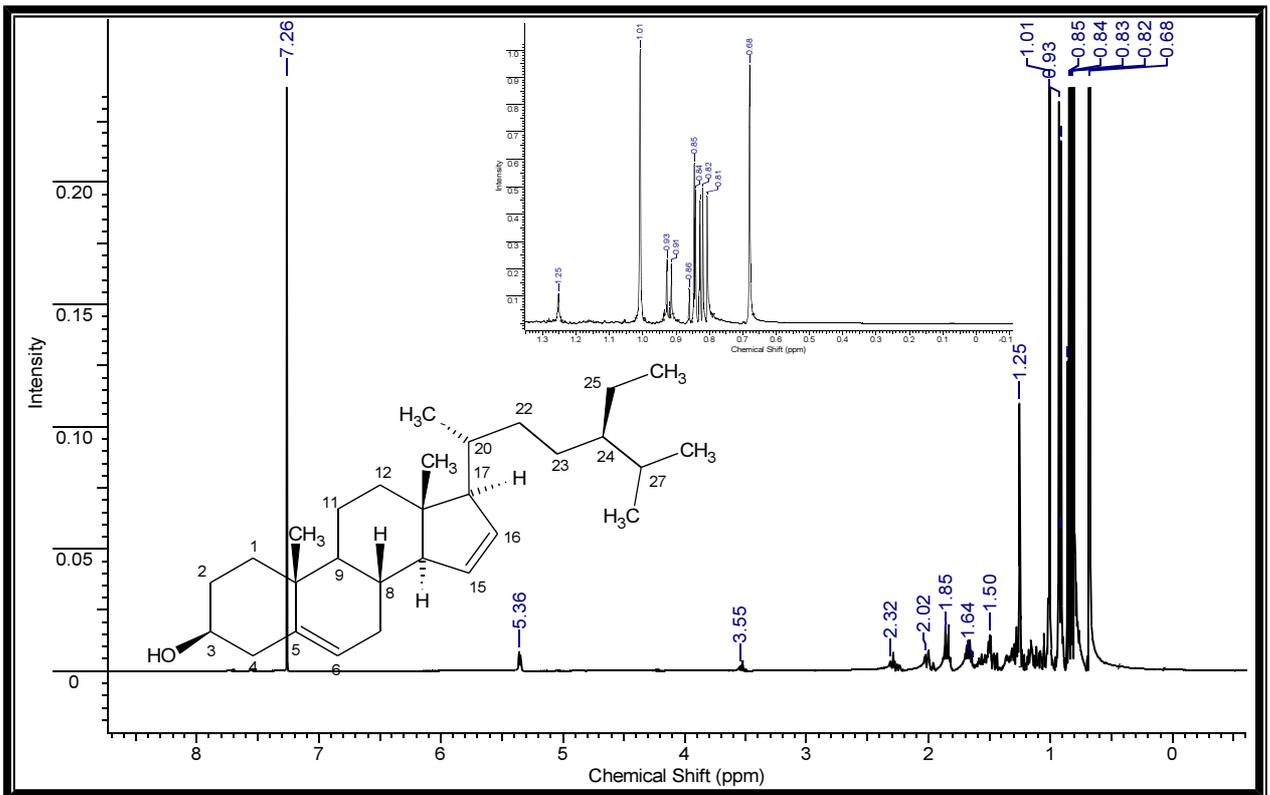


Figura 32- Espectro de RMN de ^1H de RABEC-5 (β -sitosterol) (CDCl_3 , 500 MHz)

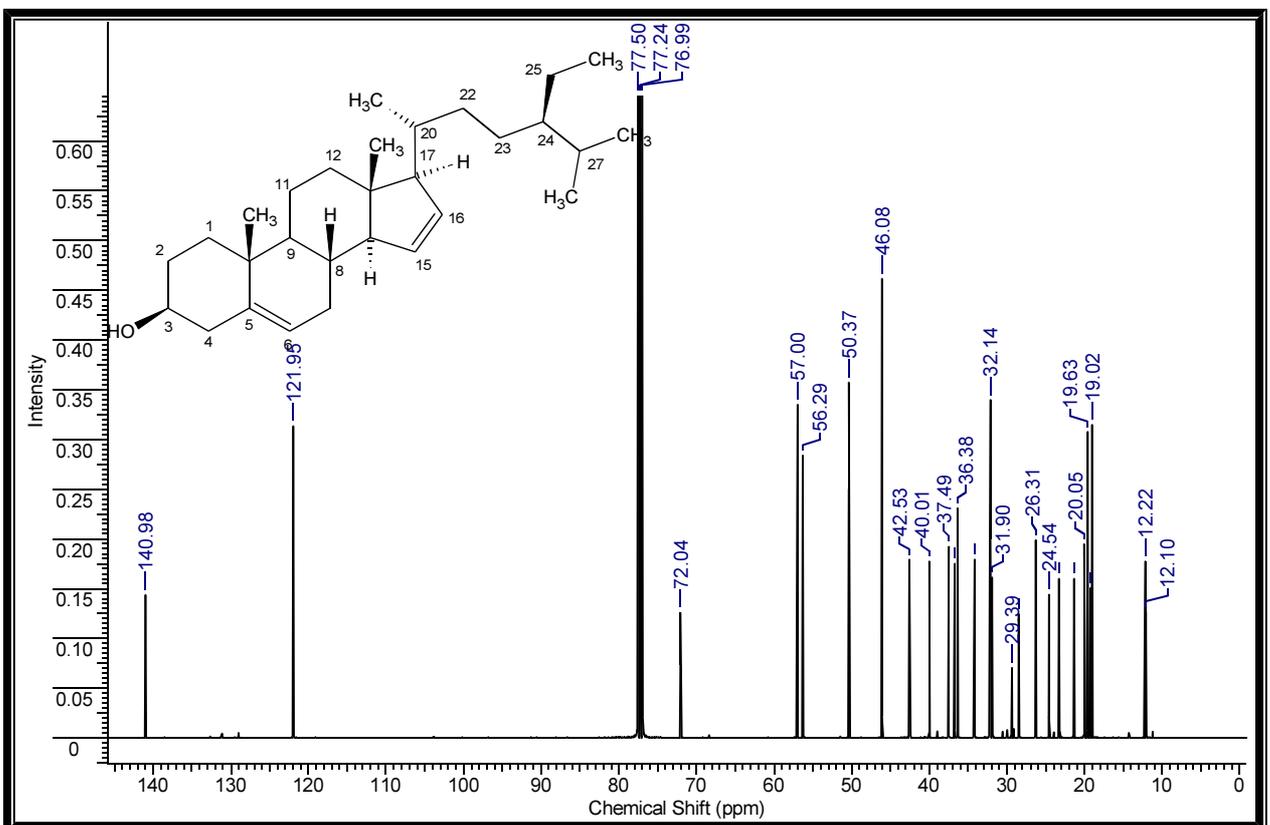


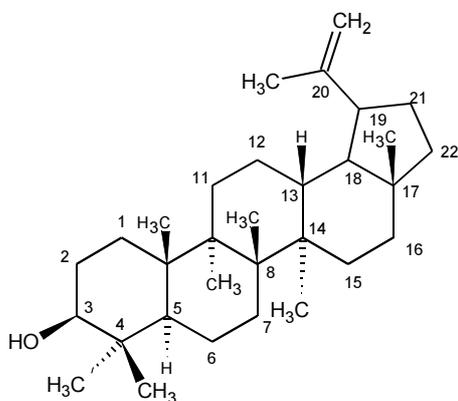
Figura 33- Espectro de RMN de ^{13}C de RABEC-5 (β -sitosterol) (CDCl_3 , 500 MHz)

Quadro 5- Comparação dos dados de RMN de ^{13}C β -sitosterol e aqueles encontrados para RABEC-5.

| Carbono número | β -Sitosterol | RABEC-5 | Carbono número | β -Sitosterol | RABEC-5 |
|----------------|---------------------|---------|-----------------|---------------------|---------|
| 1 | 37,2 | 37,3 | 16 | 28,1 | 28,3 |
| 2 | 31,6 | 31,9 | 17 | 56,1 | 56,0 |
| 3 | 71,7 | 72,04 | 18 | 11,9 | 11,9 |
| 4 | 36,4 | 36,4 | 19 | 19,3 | 19,4 |
| 5 | 140,7 | 140,9 | 20 | 36,0 | 36,2 |
| 6 | 121,6 | 121,9 | 21 | 18,7 | 18,8 |
| 7 | 31,8 | 31,6 | 22 | 33,9 | 33,9 |
| 8 | 31,8 | 31,6 | 23 | 26,1 | 26,0 |
| 9 | 50,1 | 50,1 | 24 | 45,8 | 45,8 |
| 10 | 36,5 | 36,5 | 25 | 29,1 | 29,1 |
| 11 | 21,2 | 21,1 | 26 | 19,6 | 19,8 |
| Carbono número | β -Sitosterol | RABEC-5 | Carbono número | β -Sitosterol | RABEC-5 |
| 12 | 39,7 | 39,8 | 27 | 18,9 | 19,0 |
| 13 | 42,3 | 42,3 | 24 ¹ | 23,0 | 23,0 |
| 14 | 56,7 | 56,8 | 24 ² | 11,9 | 12,0 |
| 15 | 24,2 | 24,3 | | | |

6.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO CAULE DE *Arrabidaea brachypoda*

GABEH-2 (lupeol)



$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ e PM: 456.
 TF: 290-292°C
 FORMA: Cristais Brancos

A amostra FABEH-2, apresentou-se como sólido branco e resultado conclusivo para triterpenos pentacíclicos no teste de Liebermann-Burchard. O

espectro de absorção na região do IV (fig. 34), apresenta uma banda larga em 3309 cm^{-1} , referente á deformação axial de O-H e bandas em 1014 e 982 cm^{-1} , referentes á deformação angular fora do plano C-H de alquenos. O espectro de RMN de ^1H (fig. 35) de GABEH-2 apresenta dois multipletos em δH 4,56 e δH 4,69, característicos de hidrogênios de dupla terminal. Apresenta também um duplo duplete em δH 3.18, atribuído ao H3.

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 36) de GABEH-2 apresenta sinais em δ_{C} 109,55 e 151,21, característicos de carbonos olefínicos do triterpeno lupanos (Mahato, 1994). Apresenta ainda um sinal em δ_{C} 79,24, atribuído ao carbono carbinólico. Comparando os dados de RMN de ^{13}C de GABEH-2 com aqueles do TTPC lupeol, concluiu-se que GABEH-2 se trata desse triterpeno.

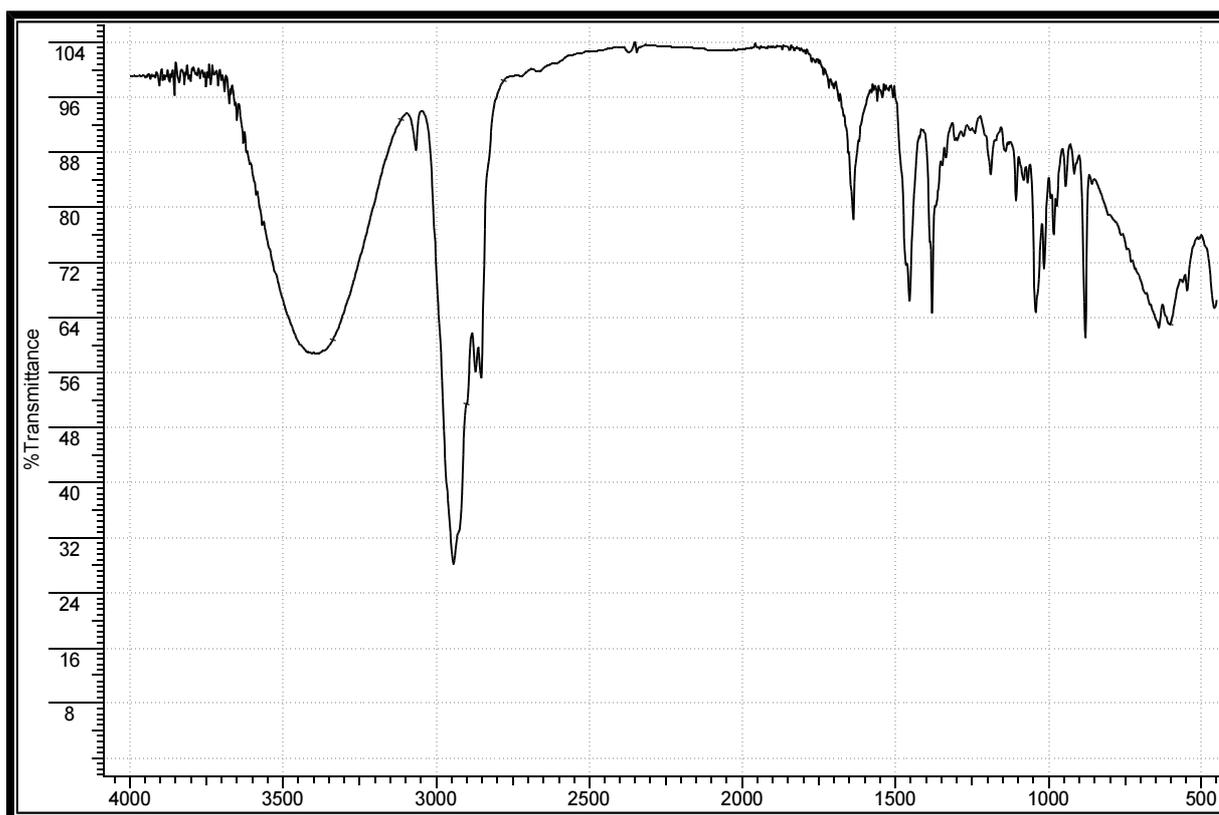


Figura 34- Espectro na região do IV para GABEH-2 (Lupeol) (KBr, cm^{-1})

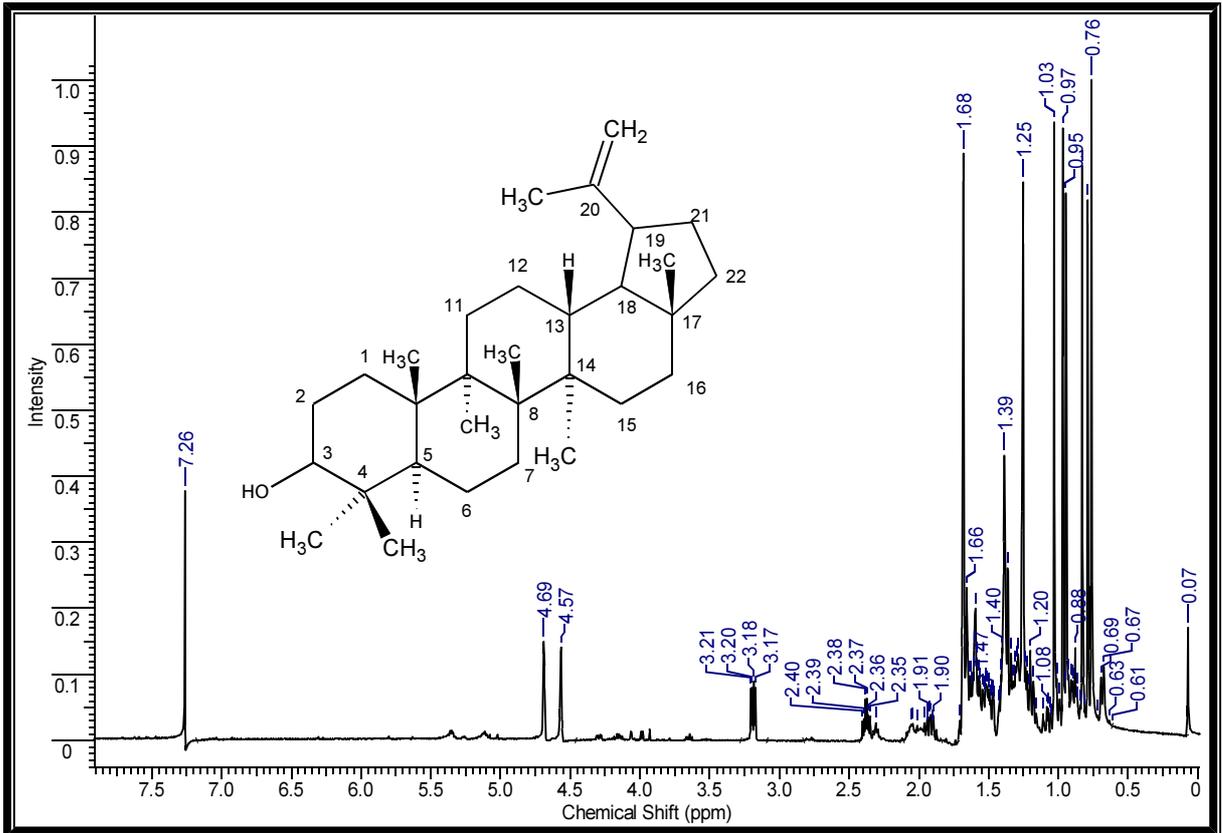


Figura 35- Espectro de RMN de ^1H de GABEH-2 (lupeol) (CDCl_3 ; 500 MHz).

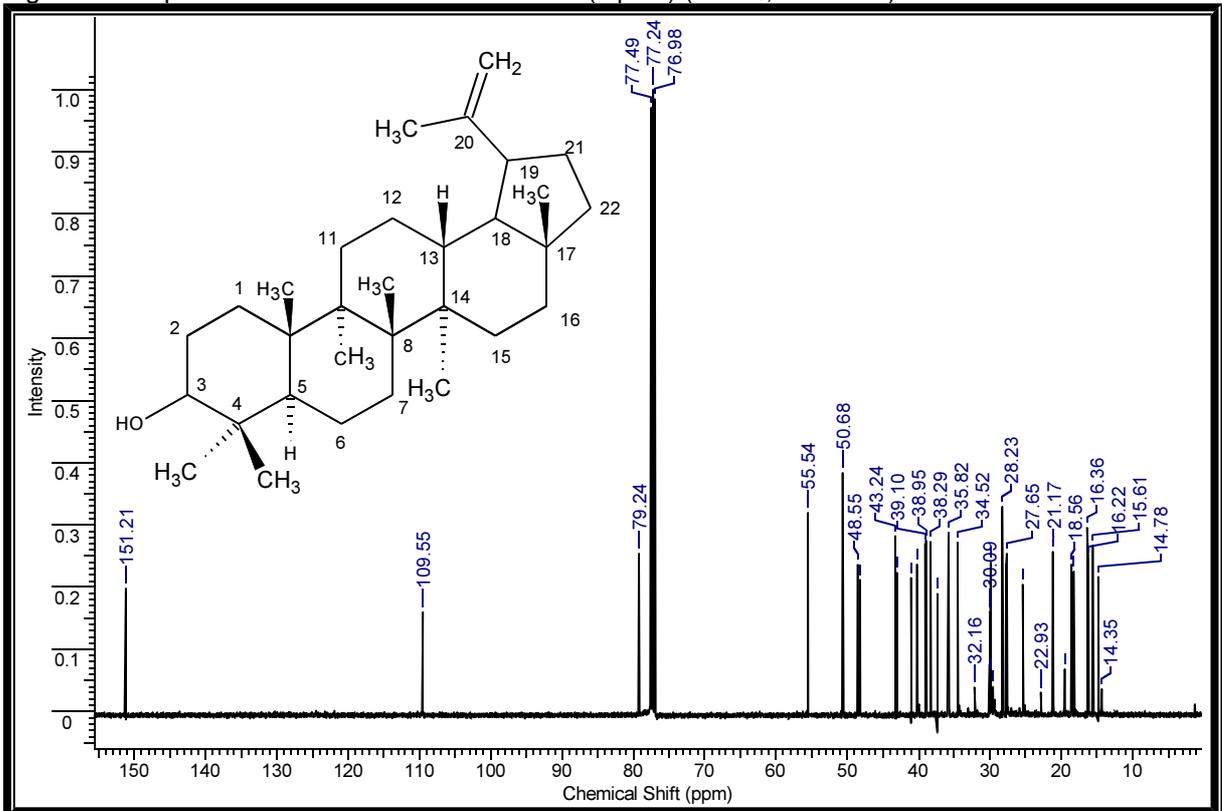


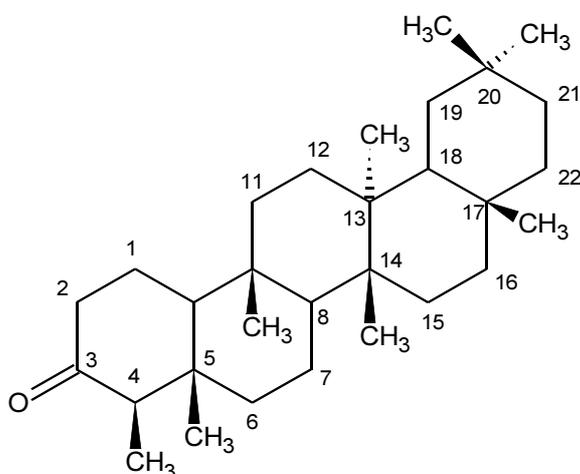
Figura 36- Espectro de RMN de ^{13}C de GABEH-2 (lupeol) (CDCl_3 ; 500 MHz).

Quadro 6- Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do Lupeol e aqueles encontrados para GABEH-2.

| Carbono número | Lupeol | GABEH-2 | Carbono número | Lupeol | GABEH-2 |
|----------------|--------|---------|----------------|--------|---------|
| 1 | 38,7 | 38,71 | 16 | 35,5 | 35,58 |
| 2 | 27,4 | 27,44 | 17 | 43,0 | 42,00 |
| 3 | 78,9 | 79,24 | 18 | 48,2 | 48,30 |
| 4 | 38,8 | 38,86 | 19 | 47,9 | 47,98 |
| 5 | 55,3 | 55,29 | 20 | 150,9 | 151,21 |
| 6 | 18,3 | 18,32 | 21 | 29,8 | 29,84 |
| 7 | 34,2 | 34,28 | 22 | 40,0 | 40,00 |
| 8 | 40,8 | 40,83 | 23 | 28,0 | 27,99 |
| 9 | 50,4 | 50,43 | 24 | 15,4 | 15,37 |
| 10 | 37,1 | 37,17 | 25 | 16,1 | 16,12 |
| 11 | 20,9 | 20,91 | 26 | 15,9 | 15,98 |
| Carbono número | Lupeol | GABEH-2 | Carbono número | Lupeol | GABEH-2 |
| 12 | 25,1 | 25,14 | 27 | 14,5 | 14,55 |
| 13 | 38,0 | 38,05 | 28 | 18,0 | 18,00 |
| 14 | 42,8 | 42,83 | 29 | 109,3 | 109,55 |
| 15 | 27,4 | 27,41 | 30 | 19,3 | 19,31 |

6.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS FOLHAS DE *Arrabidaea brachypoda*

FABEH-2 (Friedelina)



Sólido branco e cristalino
 Tf: 264-267 °C
 Fórmula molecular C₃₀H₅₀O
 Massa Molecular 426 g/mol

FABEH-2 foi obtida na forma de um sólido branco. Quando comparado com padrão autêntico apresentou mesmo Rf da friedelina e coloração amarela na placa revelada com vanilina em ácido perclórico.

O espectro no infravermelho (fig. 37) foi característico de uma substância alicíclica pelas bandas de absorção em 2915-2880 (ν C-H), 1690 (ν C=O), 1725 (ν C=O), 1460 e 1380 cm^{-1} (δ C-H). Apresentou teste de Liebermann-Buchard positivo para triterpenos pentacíclicos e RMN de ^1H (fig. 37) característico de substâncias terpenóides, não sendo observada presença de ligação dupla nem de grupos hidroxila, sinais usualmente localizados entre δ 3-5, nem sinal relativo a carbono hidroxilado no espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 (fig. 38 e 39) próximo a δ 75.

Pela análise de RMN de ^{13}C , pôde ser evidenciado um total de trinta carbonos sendo, um destes, referente a um grupo carbonila de cetona não conjugada a δ 213,18, além oito sinais no espectro de RMN de ^1H referentes aos grupos metilas entre δ 0,7 e 1,2 ligados a carbonos monossustituídos. Os demais sinais situados entre δ 1,2 e 2,5 foram atribuídos aos grupos CH e CH₂.

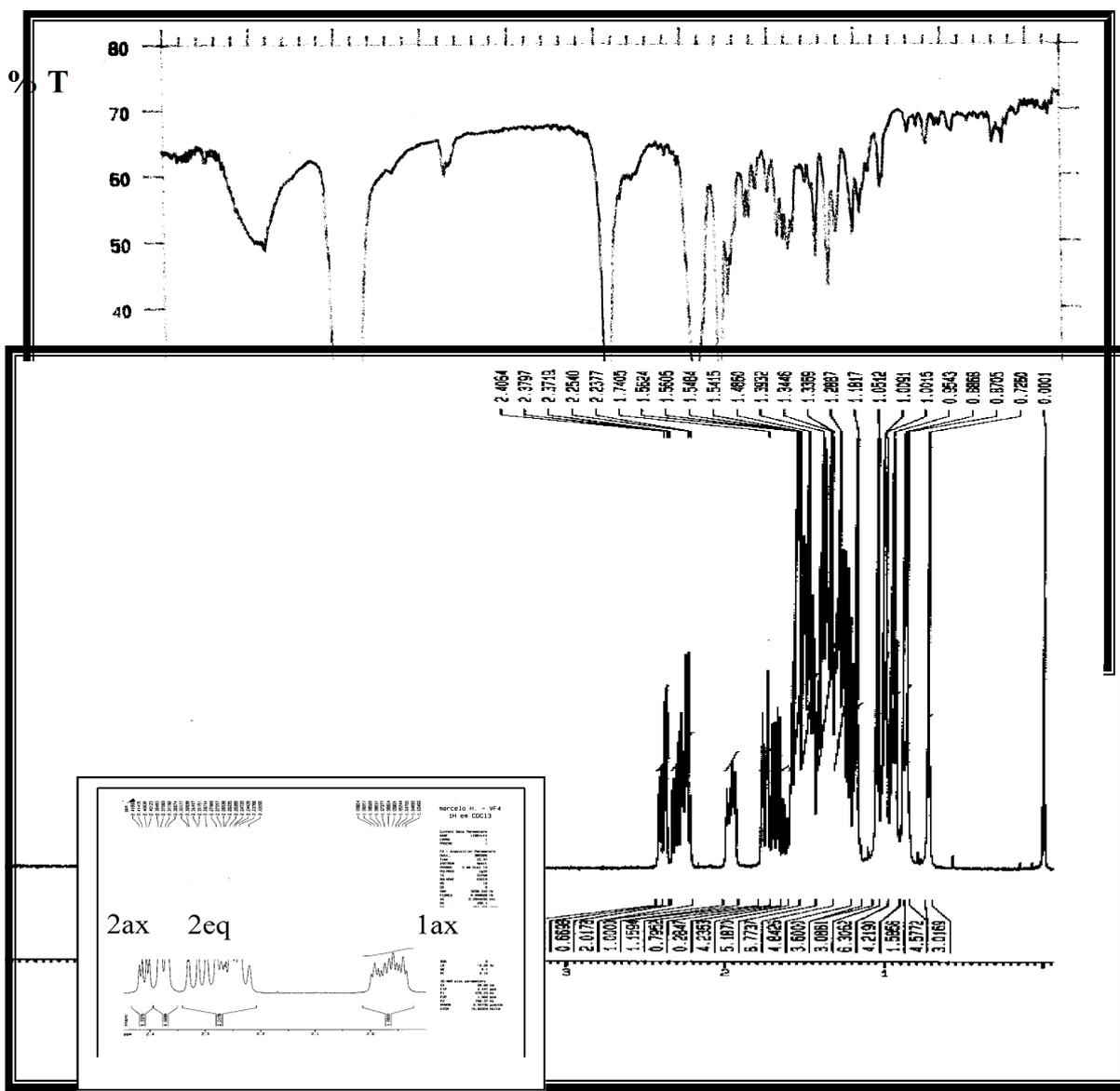


Figura 38- Espectro de RMN de ^1H de FABEH-2 (friedelina) (CDCl_3 ; 500 MHz).

Pela análise de RMN de ^{13}C , observou-se um total de trinta carbonos sendo, um destes, referente a um grupo carbonila de cetona não conjugada a δ 213,18, além oito sinais no espectro de RMN de ^1H referentes aos grupos metilas entre δ 0,7 e 1,2 ligados a carbonos monossubstituídos. Os demais sinais situados entre δ 1,2 e 2,5 foram atribuídos aos grupos CH e CH_2 . Através de comparações espectrais (MAHATO, 1994), atribuiu-se à amostra a fórmula da friedelina.

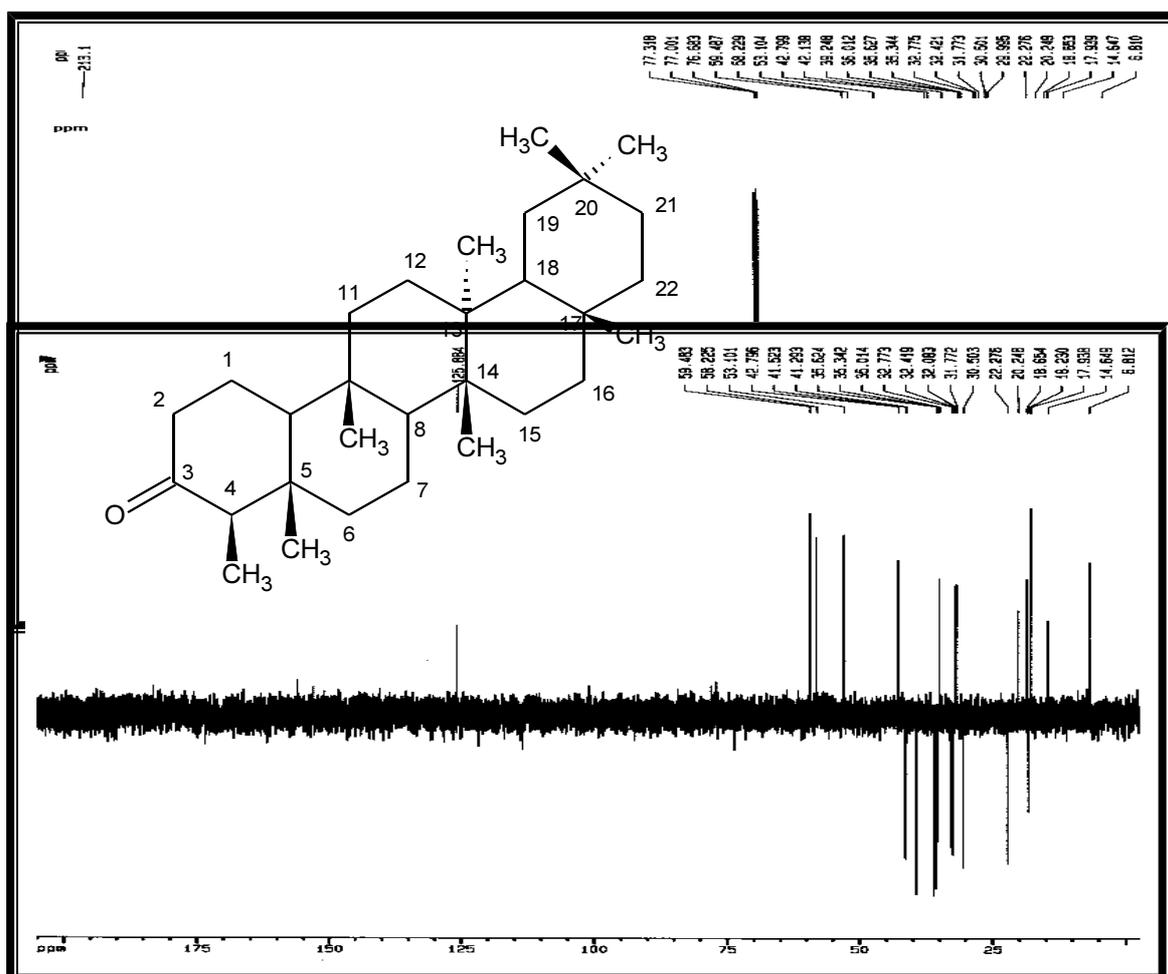
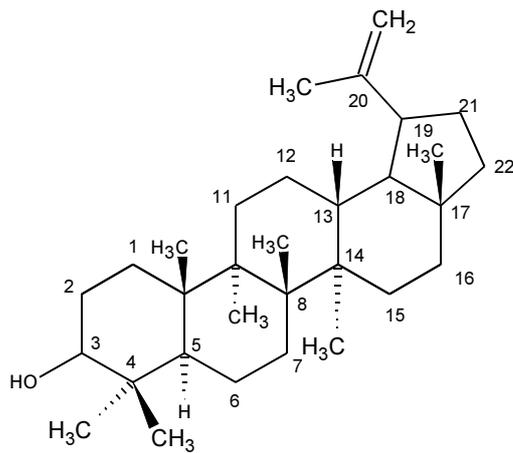


Figura 39 – Espectro de DEPT-135 a 500 MHz de FABEH-2 (Friedelina) (CDCl_3).

Figura 39– Espectro de DEPT-135 obtido para FABEH-2 (CDCl_3 , 400 MHz).

FABEH-3 (Lupeol)



$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ e PM: 456.
TF: 290-292°C
FORMA: Cristais Brancos

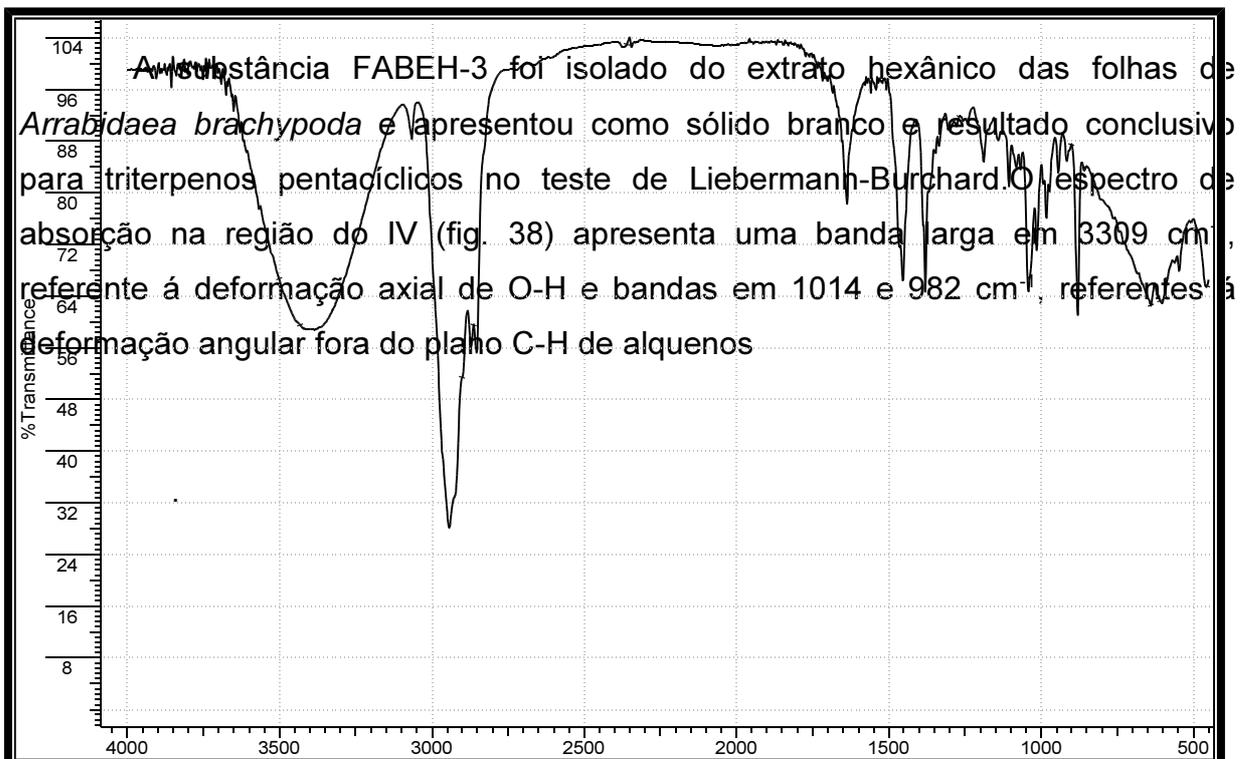


Figura 38- Espectro no IV para FABEH-3 (Lupeol) (KBr, cm^{-1}).

O espectro de RMN de ^1H (fig. 39) de FABEH-3 apresenta dois multipletos em δ_{H} 4,74 em δ_{H} 4,61, característicos de hidrogênios de dupla terminal. Apresenta também um duplo duplo em δ_{H} 3,18, atribuído ao H3.

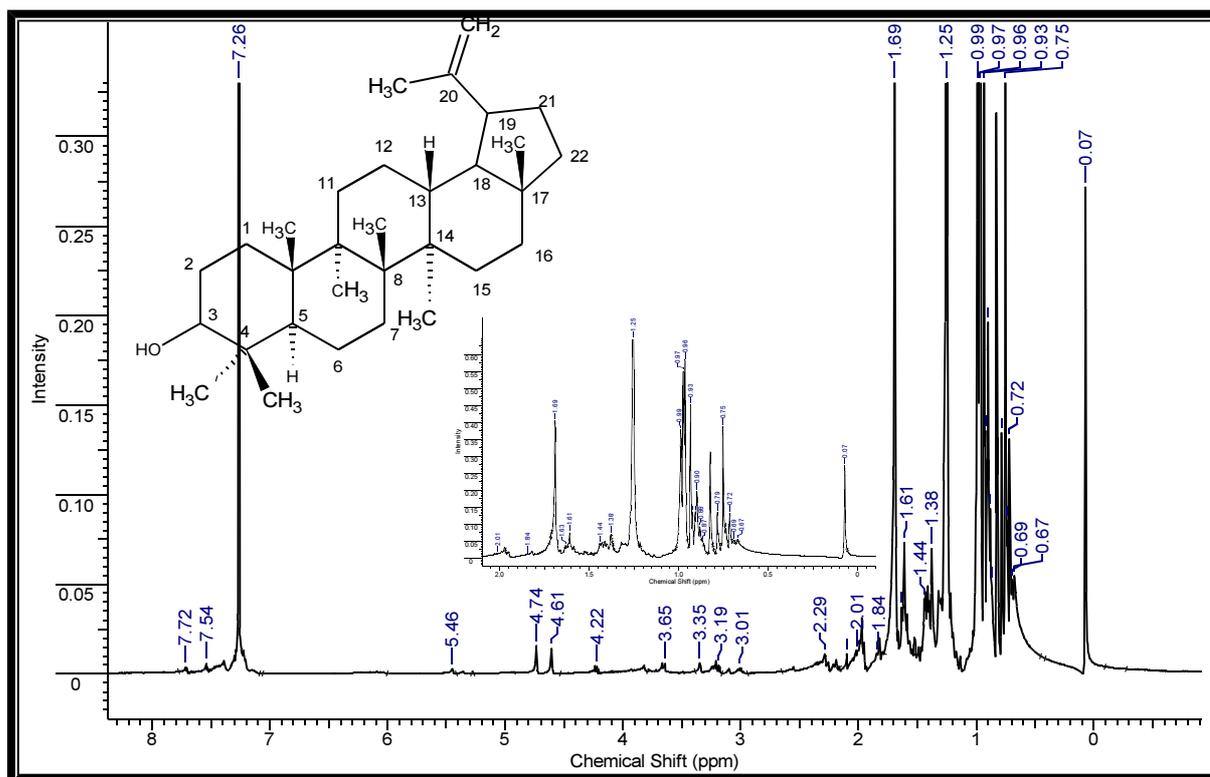


Figura 39- Espectro de RMN de ^1H de FABEH-3 (lupeol) (CDCl_3 ; 500 MHz).

O espectro de RMN de ^{13}C (fig. 41) de FABEH-3 apresenta sinais em δ_{C} 109,55 e 151,21, característicos de carbonos olefínicos do triterpeno Lupeol (Mahato, 1994). Apresenta ainda um sinal em δ_{C} 79,24, atribuído ao carbono

carbinólico. Comparando os dados de RMN de ^{13}C de FABEH-3 com aqueles do TTPC lupeol, concluiu-se que FABEH-3 se trata desse triterpeno.

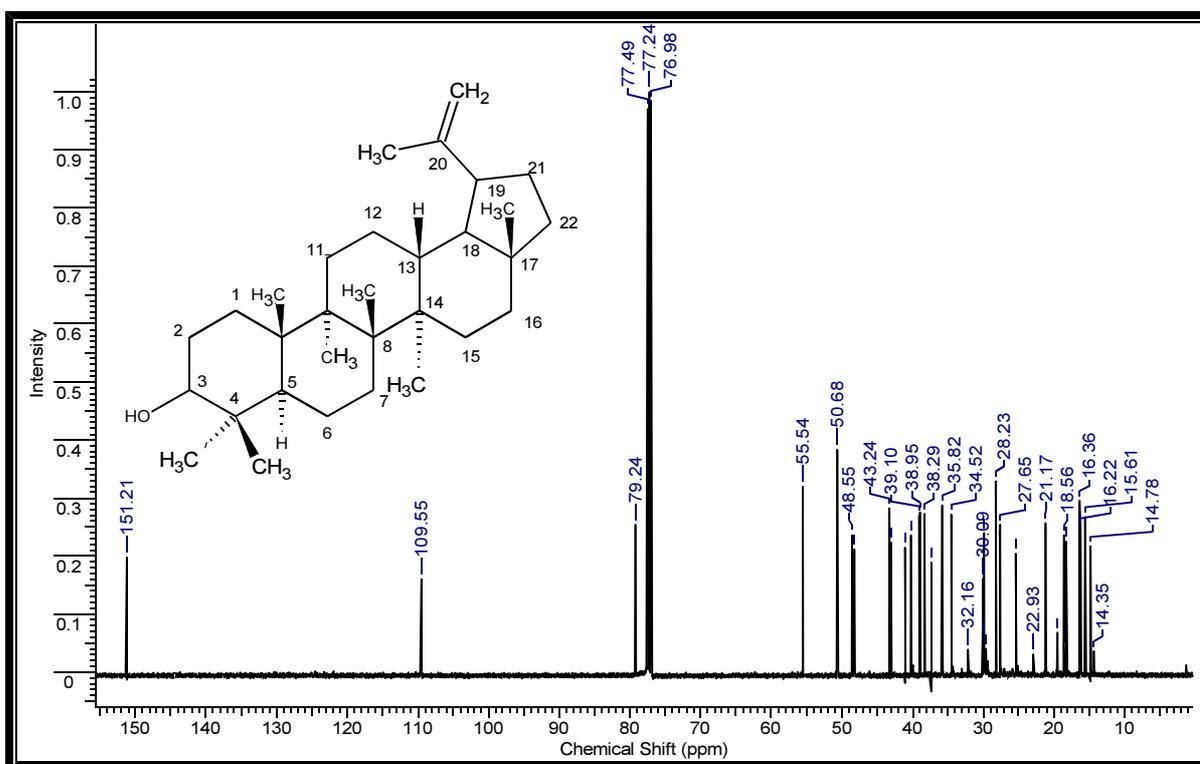


Figura 40- Espectro de RMN de ^{13}C de FABEH-3 (lupeol) (CDCl_3 ; 500 MHz).

Quadro 7- Comparação dos dados de RMN de ^{13}C do Lupeol e aqueles encontrados para FABEH-3)

| Carbono número | Lupeol | FABEH-3 | Carbono número | Lupeol | FABEH-3 |
|----------------|--------|---------|----------------|--------|---------|
| 1 | 38,7 | 38,71 | 16 | 35,5 | 35,58 |
| 2 | 27,4 | 27,44 | 17 | 43,0 | 42,00 |
| 3 | 78,9 | 79,24 | 18 | 48,2 | 48,30 |
| 4 | 38,8 | 38,86 | 19 | 47,9 | 47,98 |
| 5 | 55,3 | 55,29 | 20 | 150,9 | 151,21 |
| 6 | 18,3 | 18,32 | 21 | 29,8 | 29,84 |
| 7 | 34,2 | 34,28 | 22 | 40,0 | 40,00 |
| 8 | 40,8 | 40,83 | 23 | 28,0 | 27,99 |
| 9 | 50,4 | 50,43 | 24 | 15,4 | 15,37 |
| Carbono número | Lupeol | FABEH-3 | Carbono número | Lupeol | FABEH-3 |

| número | | | | | |
|--------|------|-------|----|-------|--------|
| 10 | 37,1 | 37,17 | 25 | 16,1 | 16,12 |
| 11 | 20,9 | 20,91 | 26 | 15,9 | 15,98 |
| 12 | 25,1 | 25,14 | 27 | 14,5 | 14,55 |
| 13 | 38,0 | 38,05 | 28 | 18,0 | 18,00 |
| 14 | 42,8 | 42,83 | 29 | 109,3 | 109,55 |
| 15 | 27,4 | 27,41 | 30 | 19,3 | 19,31 |

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

6.4.1 Avaliação da atividade analgésica do extrato etanólico das raízes de *Arrabidaea brachypoda*

Teste de contorções abdominais para EER

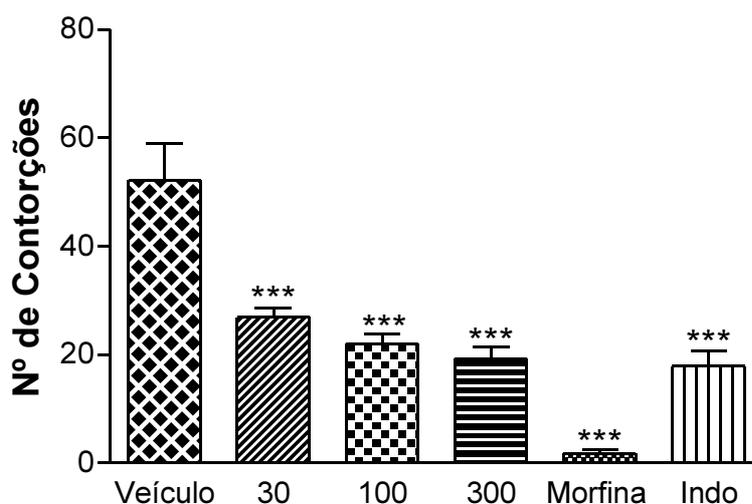


Figura 41- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de *A. brachypoda* no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle foram considerados significativos.

A sensação somática depende de nociceptores que sinalizam que o tecido corporal está sendo lesado. A classificação das drogas antinociceptivas é usualmente baseada nos mecanismos de ação no SNC ou sistema nervoso periférico (PLANAS et al., 2000). A resposta nociceptiva do ácido acético envolve a liberação de compostos endógenos como a bradicinina, prostaglandina e outros

mediadores como descrito por Deraedt et al. (1980), que observaram altos níveis destas estruturas durante os primeiros 30 minutos após a injeção de ácido acético.

Os valores obtidos no teste de contorção foram analisados através dos resultados adquiridos dos grupos controles positivos (indometacina e morfina) e os grupos tratados com o extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER).

Foram analisados os números de contorções de cada grupo e verificou-se que em cada tempo os animais tratados com o extrato das raízes de *A. brachypoda*, nas doses de 30, 100 e 300mg/kg apresentaram inibição da dor, comparados com o grupo controle.

Estes resultados indicam a atividade analgésica do EER desta planta. O modelo das contorções abdominais permite avaliar a atividade antinociceptiva que atuam tanto em nível central quanto periférico, portanto com esse resultado não se pode classificar se o extrato está agindo no Sistema nervoso Central ou Periférico ou em ambos, mas o modelo que segue permitiu obter esse resultado.

Teste da Formalina para o EER

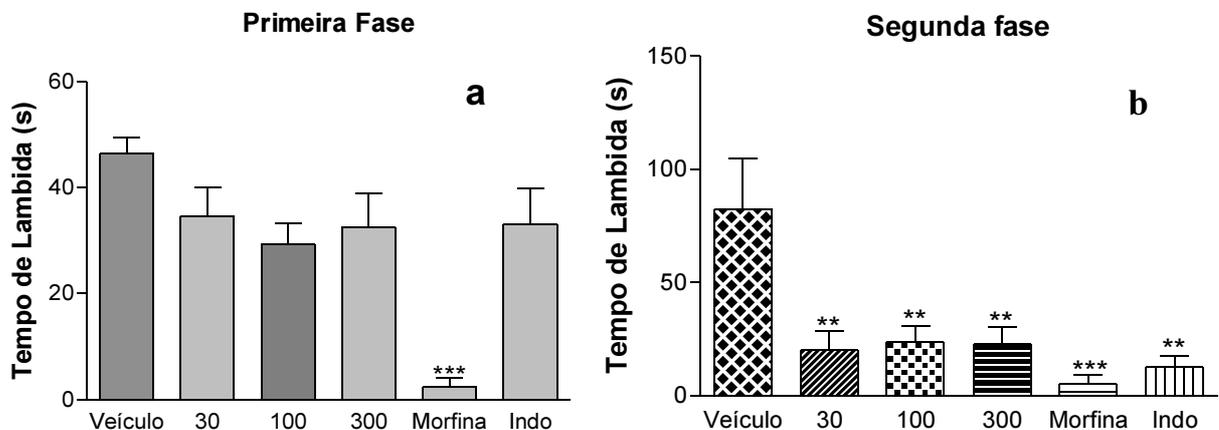


Figura 42- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de *A. brachypoda* no modelo da formalina. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

A injeção subcutânea de formalina determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva. As duas fases da resposta à formalina tem mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto à sensibilidade a drogas analgésicas. Assim é que a primeira fase

é atribuído um caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é melhor caracterizada como dor de origem inflamatória, sensível à analgésicos anti-inflamatórios não esteroidais (LAPA et al, 2008).

Os resultados apresentados nas figuras 42a e 42b mostram que o EER administrados por via oral (30, 100 e 300 mg/Kg), causou inibição significativa em todas as doses na segunda fase do modelo da nocicepção induzidas pela formalina. O efeito antinociceptivo pronunciado na fase inflamatória induzida pela formalina mostra que o extrato Etanólico Brito das Raízes de *Arrabidaea brachypoda* apresenta atividade no sistema nervoso periférico, para a confirmação desse resultado foi realizado o ensaio de Tail flick que avalia atividade no SNC.

Esta inibição do processo algésico durante a fase inflamatória do teste da formalina sugere a existência de substâncias no extrato capazes de atuar diretamente sobre as terminações nervosas periféricas, caracteristicamente pela inibição de ciclooxigenases (BISPO et al., 2001; ASONGALEM et al.,2004).

Teste de “Tail flick”

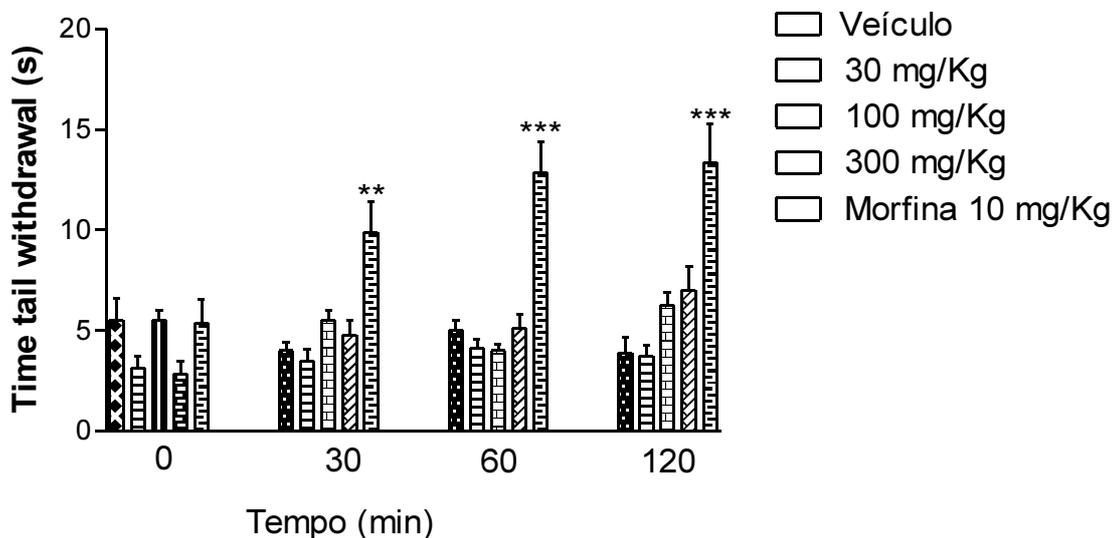


Figura 43- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de *A. brachypoda* no modelo Tail flick. **p<0,01, ***p< 0,001 em relação ao controle positivo foram considerados significativos

O modelo Tail flick permite a obtenção de informações adicionais sobre o mecanismo e o local da atividade antinociceptiva detectada. Os resultados acima sugerem que não há participação de mecanismos centrais na atividade analgésica

desse extrato, uma vez que somente a morfina em comparação com o controle, apresentou uma maior variação do tempo entre a aplicação do estímulo térmico nocivo á cauda do animal e o momento em que o animal afasta a cauda da fonte de calor.

Teste do Campo-aberto

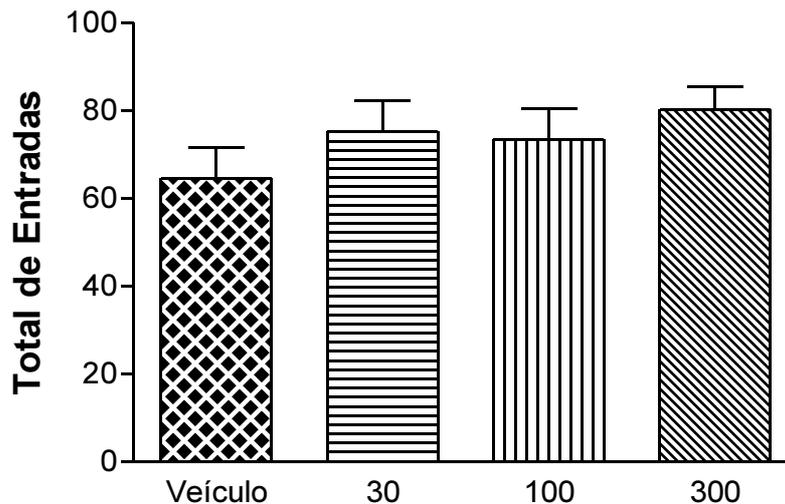


Figura 44- Avaliação do efeito do extrato Etanólico Bruto das Raízes (EER) de *A. brachypoda* sobre o comportamento dos animais no modelo do campo aberto (n=8).

Drogas que melhoram a atividade motora ou induz sedação podem fornecer resultados falso-positivo/negativo em testes de nocicepção. Dessa forma avaliou se o EER causava efeitos não específicos, tais como relaxamento muscular ou sedação. Camundongos foram submetidos ao teste do Campo aberto (RODRIGUES et al., 2002).

A avaliação da performance motora tem por objetivo detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais acurada dos resultados obtidos nos testes para determinação da atividade antinociceptiva. Portanto, drogas que promovem relaxamento ou sedação alteram a performance motora e podem interferir na resposta, sem serem necessariamente antinociceptivas (LAPA, 2008).

A figura 44 mostra que as doses de 30, 100 e 300 mg/Kg do EER não alterou o comportamento normal dos camundongos. Com isso, pode-se propor que a ação antinociceptiva desse extrato, observada na segunda fase do teste de

antinociceção induzida pela formalina não derivou de alterações neurológicas ou motoras, mas de um efeito antinociceptivo propriamente dito.

6.4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DE RABEC-1 ISOLADA DAS RÁZES DE *Arrabidaea brachypoda*

Teste das contorções abdominais

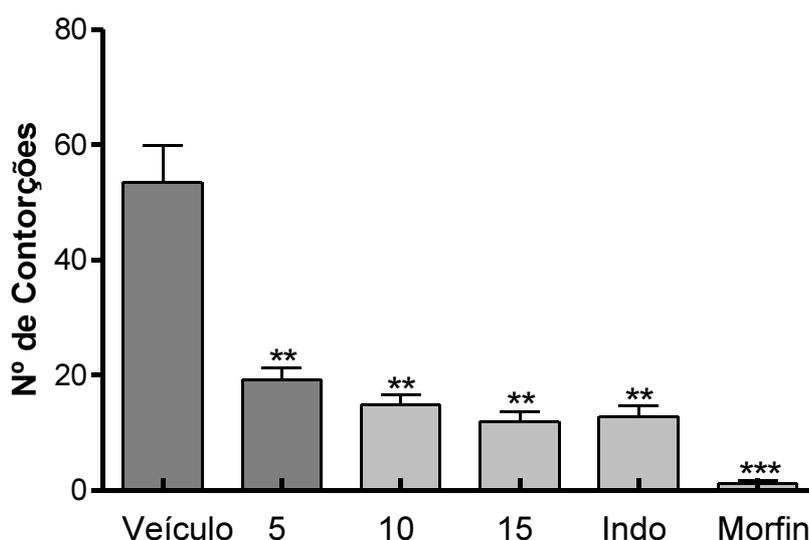


Figura 45- Atividade analgésica de extrato RABEC-1, isolada das raízes de *A. brachypoda* no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle foram considerados significativos.

Comparando-se o efeito antinociceptivo de RABEC-1 em relação controle negativo no modelo experimental das contrações abdominais induzidas pelo ácido acético pela administração pela via intraperitoneal nas doses de 5, 10 e 15 mg/Kg em camundongos, os resultados obtidos demonstram que RABEC-1 apresentou uma atividade significativa tanto quanto a indometacina.

Embora RABEC-1 tenha sido isolada do extrato clorofórmico das raízes de *Arrabidaea brachypoda*, a mesma pode estar contribuindo também para a atividade analgésica apresentada também no modelo de contorções abdominais para o EER, uma vez que a mesma esta presente também nesse extrato. Todas as doses testadas de RABEC-1 foram capazes de inibir as contorções induzidas por ácido acético, portanto a atividade analgésica periférica exibida por RABEC-1 pode estar relacionado à inibição da produção de prostaglandinas.

Teste da formalina

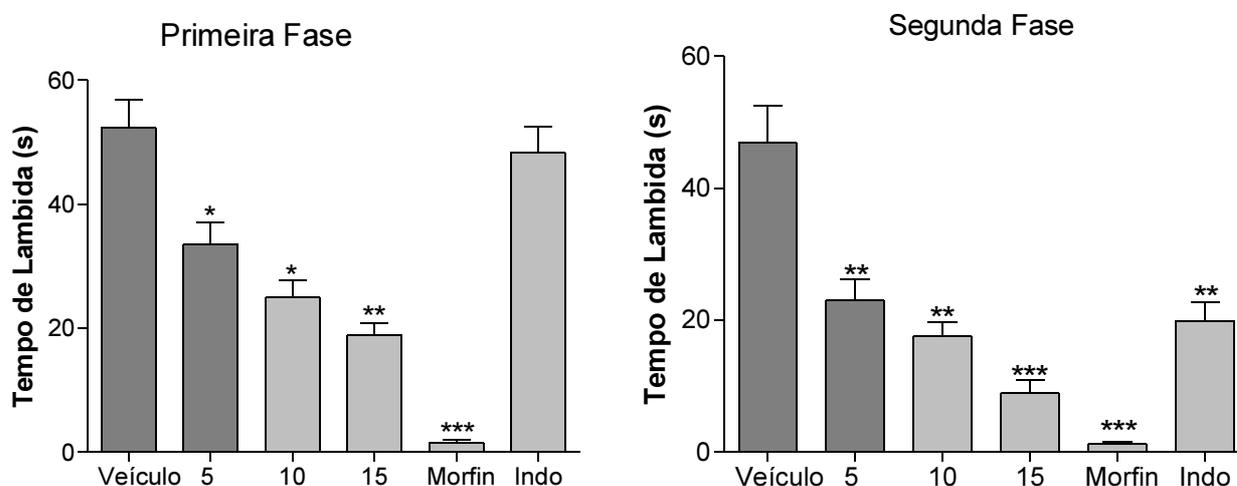


Figura 46- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de *A. brachypoda* no teste da formalina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

A atividade analgésica e RABEC-1 foi avaliada pelo método da dor induzida pela formalina. Neste teste, RABEC-1 foi capaz de inibir a dor durante as duas fases do processo algésico. Durante o desenvolvimento da dor neurogênica (fase 1), a maior atividade analgésica observada foi para a dose de 15 mg/Kg.

Durante o desenvolvimento da fase inflamatória (fase 2), RABEC-1 reduziu a dor nas 3 doses testadas sendo mais significativa para a dose de 15 mg/kg. Esta inibição do processo algésico durante a fase inflamatória do teste da formalina mostra que RABEC-1 pode atuar diretamente sobre as terminações nervosas periféricas, caracteristicamente pela inibição de ciclooxygenases (BISPO et al., 2001; ASONGALEM et al., 2004)

Teste da “Tail Flick”

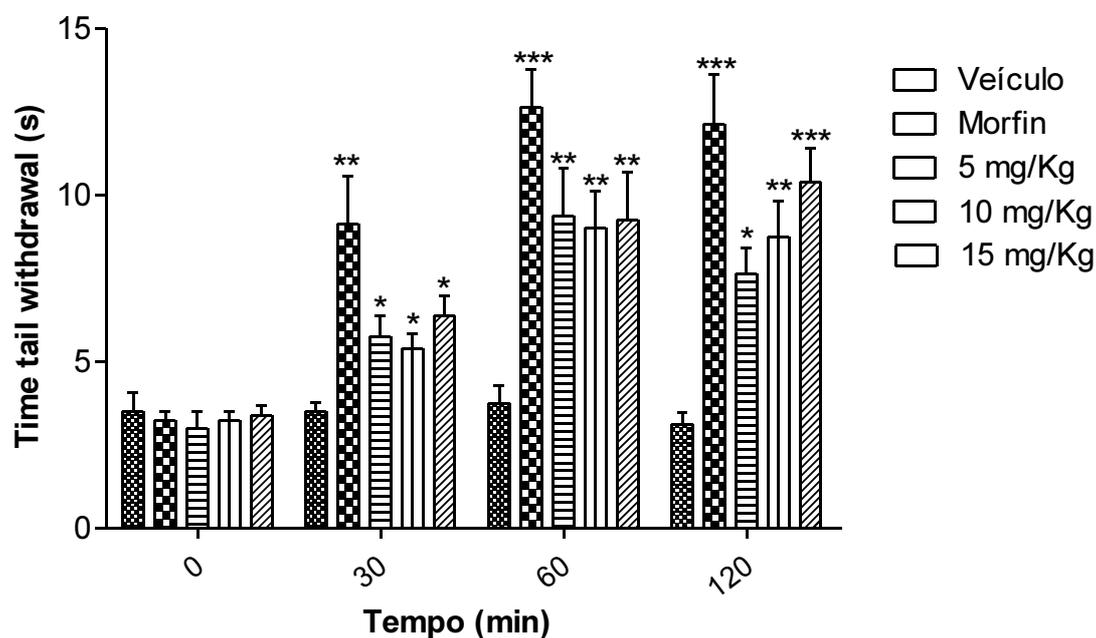


Figura 47- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de *A. brachypoda* no modelo “Tail flick”. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

RABEC-1 apresentou efeito significativo na produção da resposta analgésica em todas as concentrações quando comparados com CMC 1%, usada como controle negativo. O efeito máximo foi observado na dose de 15 mg/kg em 120 min. Esse resultado confirma aquele apresentado na primeira fase do modelo da formalina, ou seja RABEC-1 apresenta atividade analgésica no SNC.

Teste da “Hot Plate”

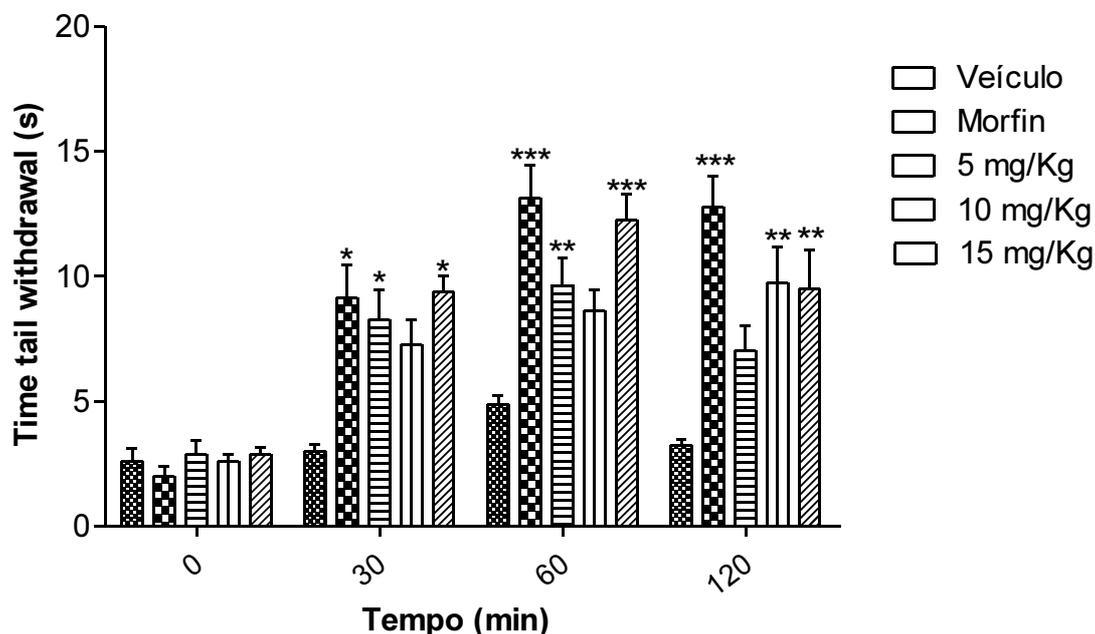


Figura 48- Avaliação da atividade analgésica de RABEC-1 isolado de *A. brachypoda* no teste da Hot Plate”. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

A morfina foi usada para avaliar a potência de RABEC-1 em relação à droga analgésica já conhecidas. Neste estudo verificou-se, em cada tempo, que os animais tratados com RABEC-1 na dose de 5 mg/kg reagiram mais rapidamente ao estímulo térmico do que os tratados com morfina enquanto que nas doses de 10 e 15 mg/Kg os animais tiveram uma reação semelhante ao do fármaco controle. Neste trabalho, o teste da placa quente evidenciou a atividade analgésica de RABEC-1 nas doses de 10 e 15 mg/kg quando comparado com a atividade da morfina (10 mg/kg).

6.4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANALGÉSICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Arrabidaea brachypoda*

Teste de contorções abdominais para EEF

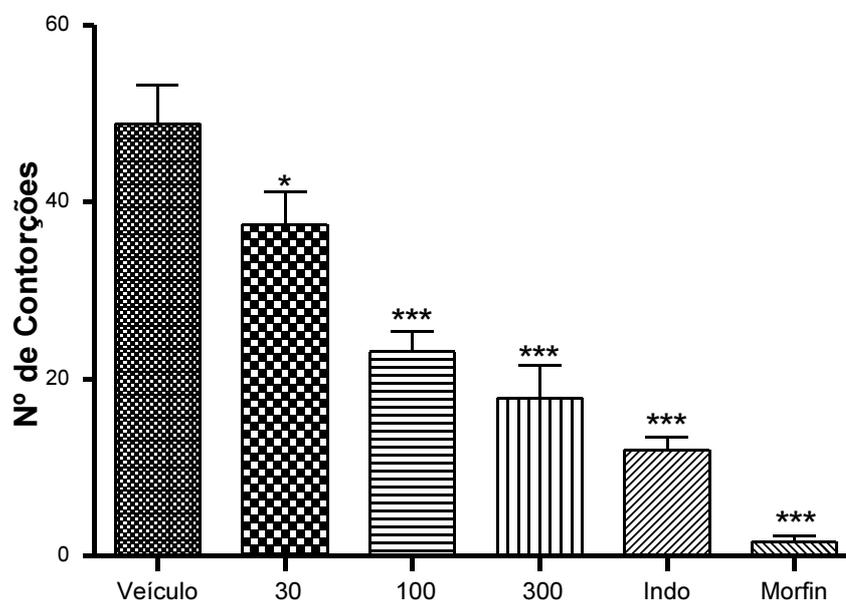


Figura 49- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Folhas (EEF) de *A. brachypoda* no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle foram considerados significativos.

No teste das contorções abdominais, o pré-tratamento pela via oral com o extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* nas doses de 30mg/kg, 100mg/kg e 300mg/kg, produziu uma inibição significativa em relação ao grupo veículo durante os 20 minutos. Do mesmo modo, os controles positivos indometacina e morfina reduziram o número acumulado de contorções.

Substâncias químicas injetadas por via intraperitoneal induzem contorções abdominais devido à sensibilização de nociceptores por prostaglandinas. Este teste é útil para avaliar a analgesia moderada produzidas por compostos antiinflamatórios, entretanto, este método é pouco específico, tornando-se necessários novos ensaios para confirmar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos com a antinocicepção obtida neste extrato. O ensaio da placa quente foi realizado a fim de avaliar a participação de mecanismos centrais na atividade analgésica desse extrato.

Teste da “Hot plate” para o EEF

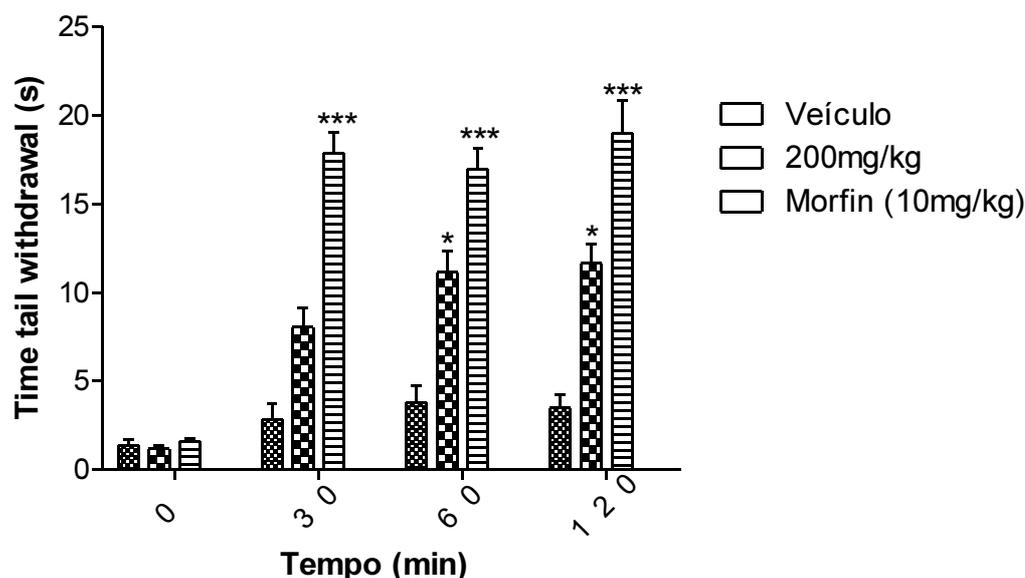


Figura 50- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto das Folhas (EEF) de *A. brachypoda* no modelo da *Hot plate* induzida por ácido acético. * $p < 0,05$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

A morfina foi usada para avaliar a potência do extrato etanólico bruta das folhas de *A. brachypoda* em relação à droga analgésica já conhecida. Neste estudo verificou-se, em cada tempo, que os animais tratados com o extrato reagiram mais rapidamente ao estímulo térmico do que os tratados com morfina. Todavia, quando o extrato foi comparado com o grupo controle, apresentou um ligeiro aumento do limiar da dor em relação ao mesmo, 60 minutos após o início do estímulo nocivo. Observando este resultado e comparando com o teste de contorções abdominais, verifica-se o extrato etanólico das folhas tem potencial analgésico.

6.4.4 Avaliação da atividade analgésica do extrato etanólico do caule de *Arrabidaea brachypoda*

Teste de contorções abdominais para EEC

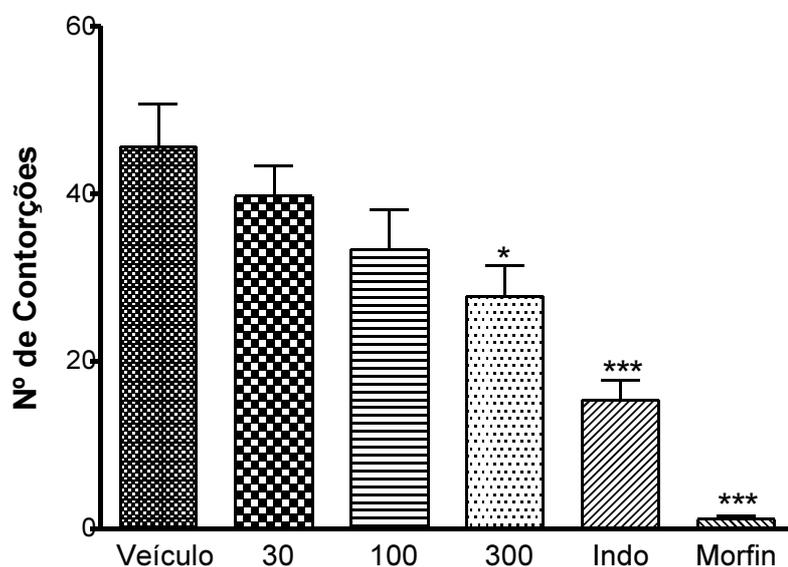


Figura 51- Atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto do Caule (EEC) de *A. brachypoda* no modelo de contorções abdominais induzida por ácido acético. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao controle foram considerados significativos.

Os valores obtidos no teste de contorção foram analisados através dos resultados adquiridos do grupo controle positivo (indometacina) e os grupos tratados com o extrato etanólico bruto do caules nas dosagens de 30, 100 e 300 mg/kg. Foram analisados os números de contorções de cada grupo e verificou-se que em cada tempo os animais tratados com o extrato caule de *A. brachypoda*, na dose de 300 mg/kg apresentou inibição da dor, comparados com a indometacina. Estes resultados indicam a atividade analgésica dos extratos desta parte da planta embora na maior dose.

Teste da *Hot Plate* para o EEC

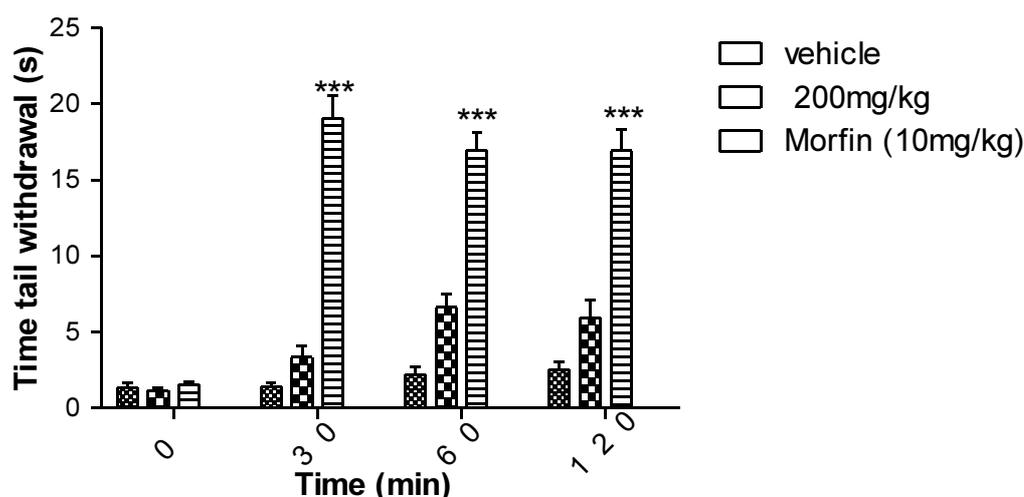


Figura 52- Avaliação da atividade analgésica do extrato Etanólico Bruto do Caule (EEC) de *A. brachypoda* no modelo da placa quente induzida por ácido acético. *** $p < 0,001$ em relação ao controle positivo foram considerados significativos.

O teste da placa quente avaliou a participação de mecanismos centrais na antinocicepção promovida pelo extrato no teste das contorções abdominais. Como o pré-tratamento com o extrato etanólico do caule de *Arrabidaea brachypoda* não modificou a reatividade dos animais ao estímulo térmico, este resultado sugere, que não há participação de mecanismos centrais na atividade analgésica desse extrato. O teste da placa quente é seletivo para componentes analgésicos tipo opióide, só permitindo avaliar substâncias com esse tipo de analgesia

Considerando que o pré-tratamento com o extrato etanólico do caule de *Arrabidaea brachypoda* não alterou a reatividade dos animais ao estímulo térmico da placa quente, e que a presença de substâncias com atividade analgésica neste extrato foi evidenciada somente na dose de 300 mg/Kg no teste das contorções abdominais considera-se que o extrato etanólico do caule de *Arrabidaea brachypoda* não seja promissor no tratamento da dor.

6.4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das cascas de raízes de *Arrabidaea brachypoda*

Edema de pata

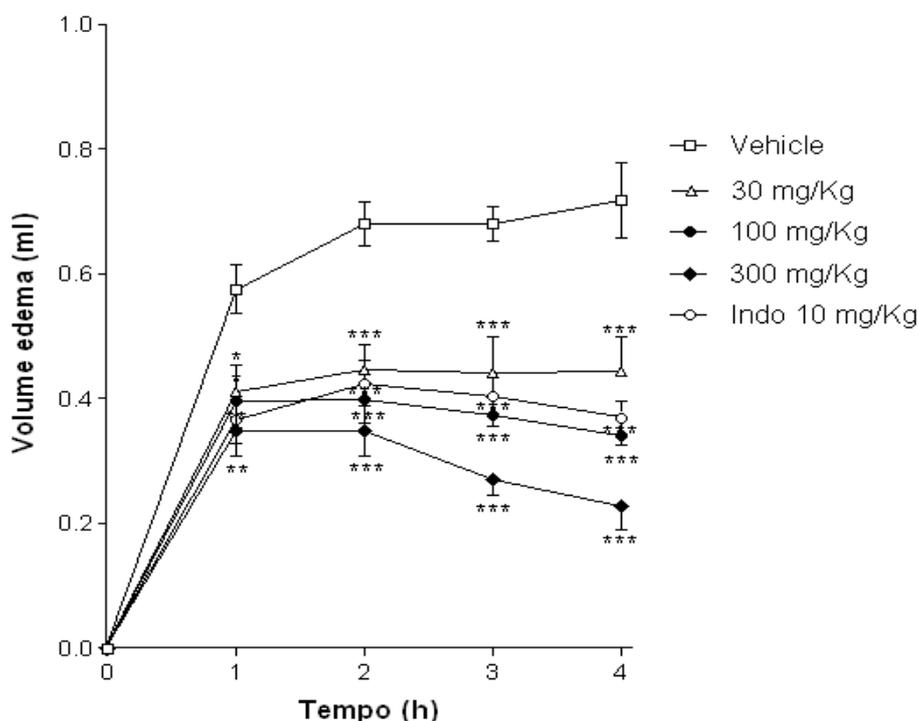


Figura 53- Atividade anti-inflamatória do extrato Etanólico Bruto das Raízes *A. brachypoda* (EER) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

O deslocamento provocado pela pata dos animais nos tempos de 1h, 2h, 3h e 4h foi considerado como o edema resultante na pata do animal pela agressão do agente flogístico (carragenina 0,1 mg/pata no volume de 0,1 ml). Esta substância aumenta os níveis de prostaglandina, como foi demonstrado por Northey et al. (1999).

A figura 53 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (1%; i.pl.) com o extrato etanólico das cascas das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (EER; 30,100 e 300 mg kg⁻¹; p. o), utilizando indometacina (D; 10mg kg⁻¹; p.o.) como controle positivo, por ser um antiinflamatório não esteroideal padrão para esse tipo de teste. Os resultados obtidos indicam que o EER causou redução da média do edema induzido por carragenina em relação ao controle do teste, sendo bastante significativa em todas as doses testadas. A porcentagem de inibição do edema na 3ª hora após indução da carragenina foi de 25,3, 32,8 e 40,4% para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg do extrato, respectivamente. A Indometacina (10 mg/kg) inibiu 52,6% do edema.

A atividade constatada pode ser relacionada aos constituintes químicos isolados, uma vez que a literatura descreve alguns trabalhos que demonstram significativa atividade anti-inflamatória dos compostos lupeol (Geetha & Varalakshmi, 2001), sitosterol e β -amirina. (GOMEZ et al., 1999; SENATORE et al., 1989).

De acordo com Geetha 2001, a atividade anti-inflamatória dos triterpenos tem sido motivo de muitas pesquisas, sendo perfeitamente justificável, devido a vasta diversificação estrutural que esta classe de compostos é capaz de apresentar. Os triterpenóides 18β -olean-12-eno-3 β ,30-diol, 18β -olean-9,12-dieno e olean-11,13-dieno-3 β , 30-diol, derivados da série do oleanano, em testes de edema de pata de rato induzido por carragenina, mostraram significativa inibição do edema por administração via oral (ID_{50} = 90; 130 e 88 mg/Kg, respectivamente) e tópica (ID_{50} = 1,9; 2,8 e 1,7 mg/Kg).

Peritonite induzida por LPS

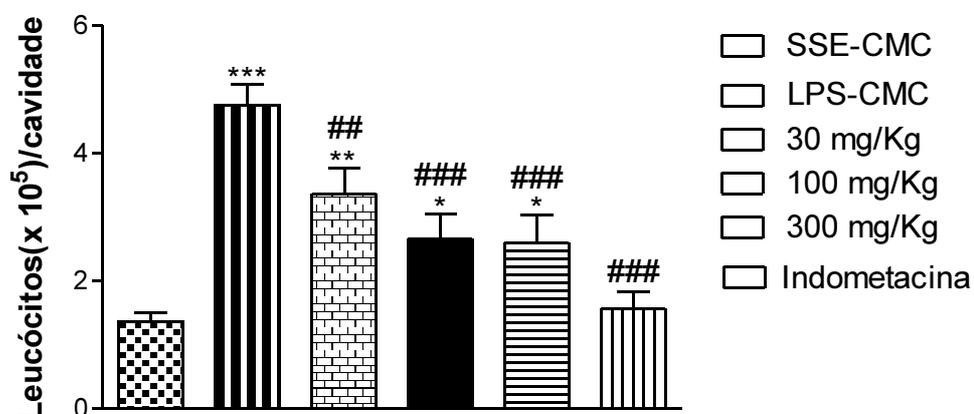


Figura 54-Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato Etanólico Bruto das Raízes *A. brachypoda* (EER) no modelo de Peritonite induzido por LPS. * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação aos controles.

Endotoxinas como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos têm participação importante em diversos processos infecciosos, sendo potentes estimuladores da produção de citocinas por macrófagos e monócitos (Amura et al., 1997).

A figura 54 mostra que os animais do grupo LPS-C apresentaram número significativamente maior de células inflamatórias no lavado peritoneal em relação aos animais inoculados com SSE, confirmando a efetividade do estímulo com LPS.

Os animais do grupo LPS-EER apresentaram significativamente menos células no influxo inflamatório em relação ao grupo LPS-C, indicando que o extrato etanólico das raízes de *Arrabidaea brachypoda* pode deprimir significativamente o influxo de leucócito para o sítio da inflamação.

Resultado Granuloma

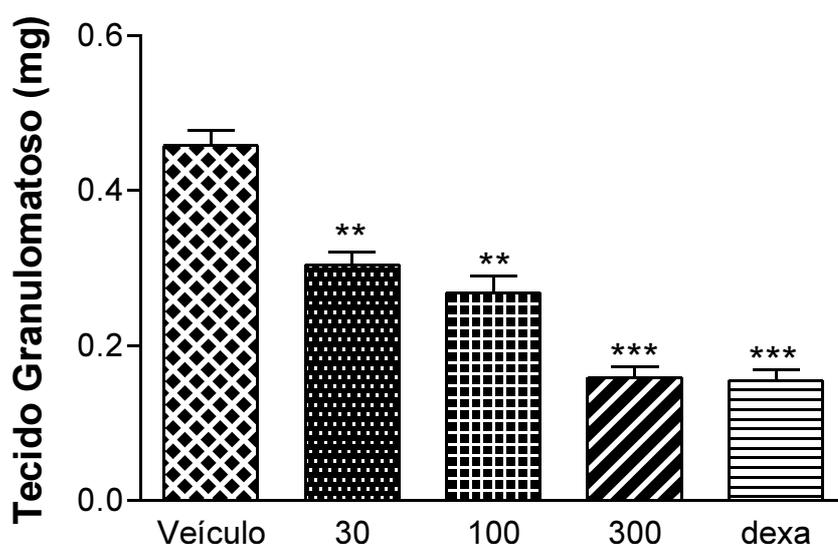


Figura 55- Efeito do EER de *A. brachypoda* na formação de granuloma em animais tratados com 30, 100 e 300 mg de extrato, com indometacina ou CMC(1%). **p<0.01e ***p<0,001em relação ao controle.

O tratamento dos animais durante 7 dias levou a uma redução significativa no peso do granuloma nas doses testadas de 30, 100 e 300mg/kg do extrato de *A. brachypoda*, conforme demonstrados na figura acima. Nos experimentos realizados, o peso dos granulomas dos animais tratados com dexametasona e co o EER na dose de 300 mg/Kg tiveram a menor mediana. O modelo de granuloma em ratos tem sido utilizado para avaliação da reação inflamatória crônica e pode ser utilizado de maneira crônica ou sub-crônica na investigação de substâncias anti-artríticas (Spector, 1960). Este modelo avalia tanto a fase transudativa quanto a fase proliferativa da inflamação crônica. Substâncias antiinflamatórias como MAINEs e também a dexametasona interferem no processo de formação do granuloma suprimindo a fase inicial de infiltração de neutrófilos no granuloma (Bailey, 1982).

6.4.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória de RABEC-1 isolada das raízes de *Arrabidaea brachypoda*

Edema de pata induzido por carragenina

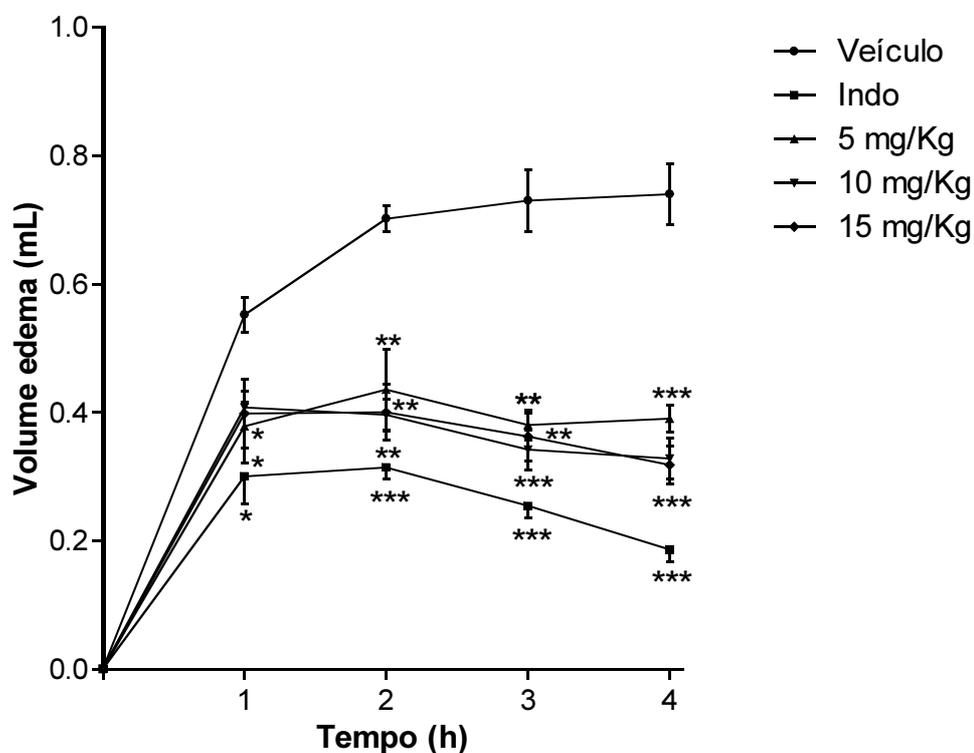


Figura 56- Avaliação da atividade anti-inflamatória de RABEC-1 isolada das raízes *A. brachypoda* no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

A figura 56 mostra que a substância RABEC-1, apresentou significativa redução no edema em todas as doses testadas quando comparadas com o grupo controle. A partir da 2ª hora essa redução tornou-se mais acentuada.

A indometacina, considerada um inibidor da ciclooxigenase é capaz de impedir esse processo inflamatório. Portanto, sugere-se que o mecanismo de ação de RABEC-1 esteja relacionado à inibição de síntese de prostaglandina, como ocorre no mecanismo anti-inflamatório da indometacina, no processo inflamatório induzido por carragenina (DI ROSA; PAPADIMITRIOU; WILLOUGHBY, 1971).

Muitos triterpenos pentacíclicos com estruturas semelhantes ao 3 β -esteariloxi-olean-12-eno apresentaram atividade anti-inflamatória, podendo existir algum ponto em comum na molécula que proporcione essas propriedades anti-inflamatórias (TAPONDJOU et al., 2003).

Embora o mecanismo de ação anti-inflamatória de alguns desses triterpenos já estejam estabelecidos, os resultados a respeito do papel anti-inflamatório do 3 β -esteariloxi-olean-12-eno não nos permitem propor um mecanismo de ação preciso para tal efeito.

6.4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de *Arrabidaea brachypoda*

Edema de pata induzido por carragenina

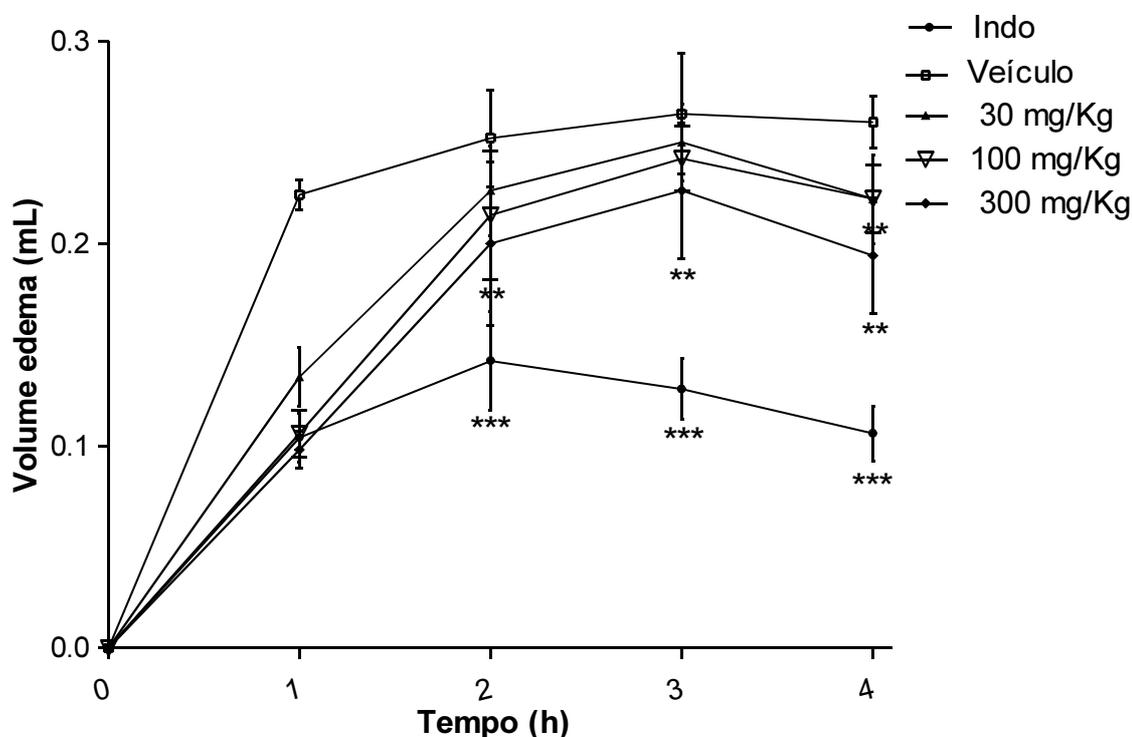


Figura 57- Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (EEF) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle .

A Figura 57 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (1%; i.pl.) com o extrato etanólico das folhas de *A. brachypoda* (EEF; 30, 100 e 300mg kg⁻¹; p. o), utilizando indometacina (D; 10mg/ kg; p.o.) como controle positivo. Os resultados obtidos indicam que o EEF causou redução da média do edema induzido por carragenina em relação ao controle do teste. Estudos mais completos em relação á constituição química desse extrato serão necessários na tentativa de verificar quais compostos são responsáveis por essa ação.

6.4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de caules de *Arrabidaea brachypoda*

Edema de pata induzido por carragenina

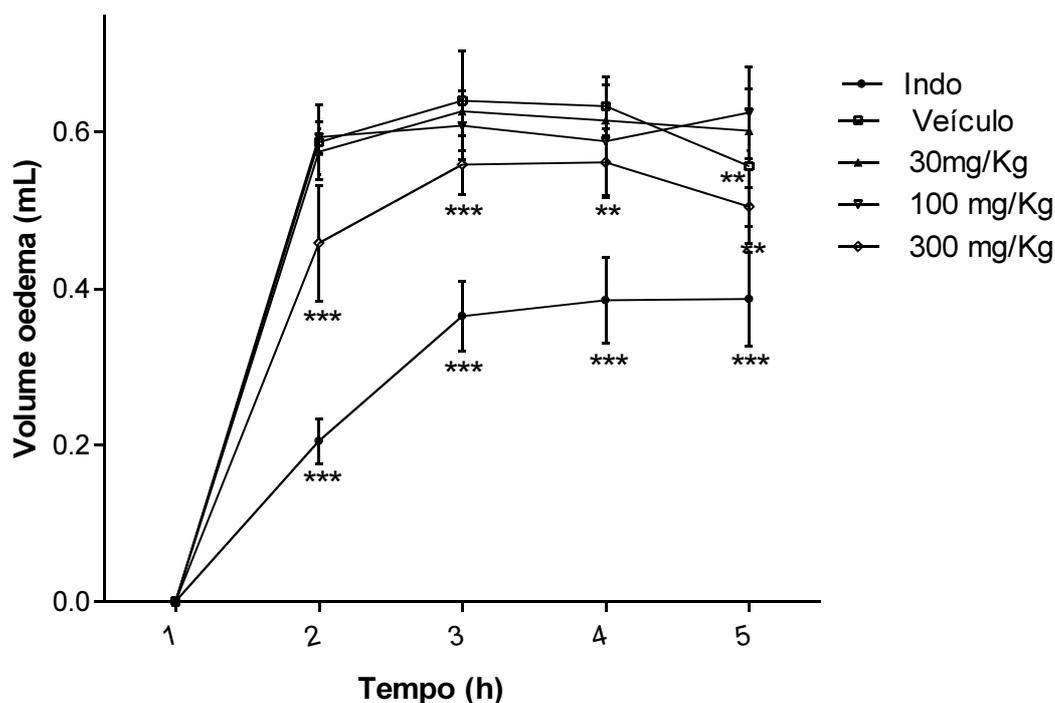


Figura 58- Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto do caule *A. brachypoda* (EEC) no modelo de edema de pata induzido por carragenina. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao controle foram considerados significativos.

A Figura 58 mostra os resultados dos testes de edema induzido por carragenina (1%; i.pl.) com o extrato etanólico do caule de *Arrabidaea brachypoda* (EE; 30, 100 e 300mg/kg; p. o), utilizando indometacina (D; 10mg kg⁻¹; p.o.) como controle positivo. O mesmo provocou uma redução no edema na dose de 300mg/Kg. No ensaio de avaliação da atividade analgésica o extrato também apresentou resultado significativo na máxima dose testada. Isso sugere que o EEC de *Arrabidaea brachypoda* pode apresentar atividade analgésica e anti-inflamatória em doses iguais ou superiores a 300 mg/Kg, isso torna o extrato pouco viável no tratamento da dor e inflamação.

6.4.9 Ensaios *in vivo* da toxicidade dos extratos de *Arrabidaea brachypoda*

No ensaio de toxicidade aguda para os extratos avaliados nos bioensaios não foi observado índice de mortalidade em nenhum animal após 7 dias mesmo utilizando doses de 5000mg/kg. Isso não significa que o extrato não apresente toxicidade.

7 CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos conclui-se que:

-A partir da análise fitoquímica da espécie *Arrabidaea brachypoda* foram isoladas e caracterizadas substâncias já conhecidas, porém referenciadas pela primeira vez nesta espécie;

-Os resultados obtidos a partir da avaliação analgésica e anti-inflamatória de RABEC-1 confirmam e estendem os dados descritos na literatura e mostram claramente que os triterpenos apresentam uma importante ação antinocicepitiva, tanto na nocicepção de origem neurogênica e inflamatória

-Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que os extratos e compostos obtidos de produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de plantas medicinais, ainda têm e continuarão tendo um lugar importante no processo de descoberta de novos medicamentos, particularmente no desenvolvimento de fármacos para o controle farmacológico da dor e de processos inflamatórios.

8 PERSPECTIVAS

Após o desenvolvimento deste trabalho, ficam algumas propostas para estudos futuros mais aprofundados:

-Os extratos promissores podem ser avaliados profundamente. Suas constituições fitoquímicas poderiam ser elucidadas melhoradamente e assim poder-

se-ia fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e suas atividades biológicas;

–Realizar ensaios da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, poder-se-ia empregar alguns ensaios mais específicos, procurando contribuir ainda mais para a validação da espécie;

–A citotoxicidade poderia ser avaliada em cultura sobre linhagens de células normais e/ou transformadas;

–Poder-se-ia isolar e caracterizar os compostos dos extratos mais polares, principalmente os compostos fenólicos que são potenciais na atividade antioxidante, uma vez que o estudo da atividade e do mecanismo antioxidantes dos extratos naturais utilizados na medicina tradicional com finalidade anti-inflamatória se tornou igualmente interessante.

Os extratos e composto isolado de *Arrabidaea brachypoda* neste trabalho são promissores. Contudo maiores esclarecimentos se fazem necessários sobre os mecanismos moleculares que envolvem os efeitos farmacológicos destes agentes. E a partir destes dados, propor a utilização de espécies ricas em triterpenos como uma alternativa terapêutica oferecendo perspectivas de um adjuvante (Fitoterápico) com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, contribuindo desta forma para o desenvolvimento regional, propriedade intelectual e para a conservação da biodiversidade brasileira (patrimônio genético).

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKARCA, U.S. Gastrointestinal effects of selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Curr. Pharm. Des.** v.11, p.1779-1793, 2005.

AKEMURA, O. S. M. et al. Flavones from leaves of *Arrabidaea chica* **Phytochemistry**.v.38, p.1299-1321, 1995.

ALCERITO, T. et al. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity **Bioche Syst. and Ecology.**, v.30, p.677, 2002.

ALVIANO, D.S.; et al. Antinociceptive and free radical scavenging activities of *Cocos nucifera* L. (Palmae) husk fiber aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.** V.92, p.269-273, 2004.

AMARAL, R. R. et al. **Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante em extratos de folhas de *Arrabidaea chica***. In.: Reunião anual da sociedade Brasileira de Química, 18, 2004.

ARAGAO, G. F. et al. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.). **Pharmacol Biochem Behav**, v.85, n.4, p.827-34, 2006.

ARAGAO, G. F., et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) . **J Herb Pharmacother.** v.7, n.2, p.31-47. 2007.

ASONGALEM, E.A.; et al. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **J Ethnopharmacol.** v.91, p. 301-308, 2004.

BAILEY, P.J. Antiinflammatorische Wirkungen und Pharmakokinetik eines standardisierten Kiefernriindenextraktes **Biochem. Pharmacol.** V.31, p.1213-1222, 1982.

BENGSHI, E.; PERLY, B.; DELEUZE, C.; VALERO, A. A. General Rule for the Assignment of the carbon-13 NMR Peaks in fatty Acid Chains. **Journaul of Magnetic Ressonance**, v.18, n.1, p.1-13, 1986.

BISPO M.D.; et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **J. Ethnopharmacol.** v.76, p. 81-86, 2001.

BOLDI, A.M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Curr Opin Chem Biol**, vol.8, p.281-286, 2004.

BOLZANI, V. S.; et al. New Antioxidant C-Glucosylxanthenes from the Stems of *Arrabidaea samyoides*. **J. Nat. Prod**, v.66, p.1384, 2006

BOLZANI, V. S.; PAULETI, P. M.; YOUNG, M. C. M. Constituintes Químicos de *Arrabidaea samyoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.5, p. 641 2003.

BRANDÃO, M. G. L. **Plantas medicinais e fitoterapia (em Minas Gerais)**. Belo Horizonte: 113p, 2003.

BRANDÃO, M. G. Ls. **Estudo Químico das raízes da *Ampelozizyplus Amazonicus* Ducke, planta utilizada popularmente na Amazônia como preventivo da malária**. 1991. Tese (Doutorado em Química), UFMG, Belo Horizonte, 1991.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.** v.100, p.131-134, 2005.

CALIXTO, J.G.; SIQUEIRA Jr, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia.** v.78, p.98-106, 2008.

CASTRO, M.S.A. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O-glicosil-dihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* ("algodãozinho"). 2000. Tese (Doutorado em Farmácia). Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

CECHINEL FILHO. V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, p.99-105, 1998.

COLLINS, C. H. et al. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 279p. 1997.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v.24, p.465, 2007

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins and in algogenic reation and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p.17, 1980.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D. A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol.** v.105, n. 4, p. 239-256, 1971.

DÖBEREINER, J. TOKARNIA, C, H & SILVA Aspectos epidemiológicos e clínico patológicos comparados da intoxicação por *Arrabidaea bilabiata*. (Bignoniaceae) em búfalos e bovinos **Pesq. Vet. Bras.** V.3, p.17-24,2004

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of "Nerve Tonics" from the Brazilian Amazon. **Intern. Found. Sci., Prov. Rep.**, v.19, p. 1438, 1987.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F.; Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **J Ethnopharmacol.** v.71,p 443- 447, 2000.

FERÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents action.** v.33, p.283-288, 1991.

FERNANDES, E.S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur. J Pharmacol**, v.569, p.228-236, 2007.

FERNANDES, J.; C. et al. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on muitidrug resistant and leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v.190, p.165-169, 2003.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.1, p.77-80, 2001.

GOMEZ, M.A et al. A Study of the topical anti-inflammatory activity of *Achillea ageratum* on chronic and acute inflammation models. **Journal of Biosciences**, v.54, n.11, p.937-41, 1999.

GOODMAN, H.G. GILMAN **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed, p. 424-431. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2007.

GOSMANN, G.; GNOATTO, S. C. G.; VECHIA, L. D.; Derivados oleananos e Ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade

antitumoral, antiinflamatória e antioxidante. **Química Nova**. v.32, p. 1245-1261, 2009.

HARVEY A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Disc Today** 5, 294–300. (2000)

HOLANDA PINTO, S. A., et al. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**, v.16, n.1, p.48-52. 2008.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. EdUFSCar, São Carlos, 2003

<http://www.fapepi.pi.gov.br/carrasco/> < acesso em 20-07.2009 >

HUNSKAAR, H.S.; HOLE, K. The Formalin test in Mice: Dissociation Between Inflammatory and Non – inflammatory Pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A.; GREEN, I. R.; Lapachol: overview. **ARKIVOC (Gainesville, FL, United States)** v.2, p.145–171, 2007.

JAIN, M.K.; YU, B.Z.; et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A₂ from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**. V.39,p.537-547, 1995.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional,p.778, 1998.

JORGE, M. P.; et al.; **Journaul of Ethnopharmacology**. V..118,p.361, 2008.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v.18, p.412-416, 1959.

KUPELI, E.; et al. Antiinflammatory and antinociceptive potential of *Maclura pomifera* (Rafin). Schneider fruit extracts and its major isoflavonoids, scandenore and auricularin. **Journal of Ethnopharmacology**. v.107, p.169-174, 2006.

KURASHI, Y.; et al. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Res**. v.273, p.245-252, 1983.

KUMMER, C. L.; COELHO, T.C. Anti-inflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Rev. Bras. Anestesiol.** V. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R.L. CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica.** SBPC-Campinas-SP, 2008.

LEITE, J.P. V.; et al. Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. **Biol. Pharm. Bull.** 29, 2307-2309, 2006.

LIN, C.N.; et al. Synthesis and antithrombotic of Xanthone derivatives. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 48, p. 887-890, 1996.

LORKE, D. A. New approach to practical acute toxicity testing. **Arch. Toxicol.** v.54, p.275-287, 1983.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v.25, n. 3, p.429-438, 2002.

MACLEAM, S.; et al. Unambiguous structural and nuclear magnetic resonance spectral characterization of two triterpenoids of *Maprounea guianensis* by two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Can J. Chem.** 2519p., 1987.

MAHATO, S.B.; JUNDI, A. P. ¹³C-NMR Spectra of pentacyclic Terpenoids-A Compilation and Some Salient Features. **Phytochemistry**, v.37 n.6, p.1517-1575, 1994.

MARTIN, F.; et al. [Antioxidant C-Glucosylxanthones from the Leaves of *Arrabidaea patellifera*](#). **J. Nat. Prod.** v.71: p.1887–1890, 2009.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MATOS, F. J. A.. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC, 148 p, 2008

MEDEIROS, R., et al. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol**, v.559, n.2, p.227-35. 2007.

MIGUEL, O. G.; et al.. Intoxicação por *Arrabidaea bilabiata* em bovinos na Região Amazônica linuma,; **Phytochemistry**, p.38, 1995.

MIRANDA, R.R.S. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek.2007. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG. **Tese de Doutorado**, 351 p., 2007.

NEWMAN, D.J. et al. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.2: p.279-308, 2002.

NORTHEY, A. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase - 2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology, Québec**,v. 2, n.128, p.853-859,1999.

OTUKI, M. F., et al Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v.313, n.1, p.310-8. 2005.

PASSOS, G.F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.**, v.110,n.2, 323-333, 2007.

PLANAS, E. et al. Antinociceptive/anti-edema effects of liposomal morphine during acute inflammation of the rat paw. **Pharmacol**, v. 60, p.121-127, 2000.

QUEIROZ, L. P; SILVA, M. M. A Família Bignoniaceae na Região de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. **Sttientibus Série Ciências Biológicas**. Bahia, v.3,p.8, 2003.

RANG, H. P.; DALLE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. Tradução de Amaury José da Cruz Júnior. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

REISINE, T.; PASTERNAK, G. **Analgésicos e antagonistas opióides**. In: Goodman e Gilman. As bases Farmacológicas da Terapêutica. 9ª ed.; Hardman, J.

G.; Limbird, L.E.; Molinoff, P.B.; Ruddon. R. W.; Gilman. A. G. eds. McGraw Hill., p.379-404, 1996

ROCHA, A. A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da Arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC).** 2006. Dissertação. (Metrado em Química), Franca, SP, 71 p., 2006

SANCHEZ-FIDALGO, S.; et al. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective COX-2 inhibitor. **Eur. J. Pharmacol.** v.505, p.187-94, 2004.

SCHENKEL, E. P; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2.ed. Porto Alegre: Ed.da UFSC, Cap.27, p.597-622, 2000.

SENATORE, F. et al. Steroidal constituents and anti-inflammatory activity of the horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) bark. **Bollettino-Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v.65, n.2, p.137-41, 1989.

SHENCKEL, E. P.; GOEMANN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de Origem vegetal no desenvolvimento de Fármacos.** In: Simões, C.M.O.; Shenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, j.c.p., Mentz, L.A., Petrovick, P. R., Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. da Universidade/UFRGS, Porto Alegre, Florianópolis, p. 292-298, 2000.

SIDALL, P. J.; COUSINS, M. J. Pain mechanisms and management: an update. Clin. And Exper. **Pharmacol. And Physiol.**, v.22, p.679-688, 1994.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R; PARENTE, J. P. Flavonal glycoides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v.53, p. 87-92, 2000

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** 6.ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos. 460p , 2000.

SIMÕES, C. M. O.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento – Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos.** 5ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p.291-320, 2003.

SPECTOR, W. G.The inflammatory response. **J. Path. Bact**, v.84, p.391-403, 1960.

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F.E. Phases of inflammatory response to subcutaneous implantation of cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. **J. Pharmacol Exp Ther.** v.183, p. 226-234,1972.

TOPAA, R. H. **Estrutura e diversidade florística das diferentes fisionomias de cerrado e suas correlações com o solo na estação ecológica de Jataí.** 1998. Tese (Doutorado em Biologia). Santa Catarina. 1998.

TAPONDJOU, L. A., et al. *In vivo* anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. **Arch Pharm Res**, v.26, n.2, p.143-6. 2003.

TROWBRIDGE, H.; EMLING, R.C. **Mediadores químicos da resposta vascular. Inflamação uma revisão de processos.** Quitessence Publishing Co. Inc., São Paulo, p.27-42,172p,1996.

UENO, A. et al. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradikinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in ip-receptor-deficient mice. **Life Sci**, v.66, p.155-160, 2000.

VANE, J. As ciclooxigenases e a fisiologia do processo inflamatório. **Revista Cox news.** v.1, n.1, p.08-15,1996.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. **Inflamm. Res.** v.44, n.1, p.1-22, 1995.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Med.**, v.55, p. 235-241, 1989.

WANMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais Sob a Óptica da Química Medicinal Moderna.** Chapecó: Argos, 479-499, 2001.

ZABOUS, F. F. et al. Variação da Toxidez de Arabidae **bilabiata** (Bignonaceae) em coelhos **Pesq. Vet. Bras.**, v.26, p.171, 2006

ZORN, B. A. J. et al. 3-Desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**. v.56, p.831-835, 2001.