

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal**

**CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DO USO  
MEDICINAL DE *Amburana cearensis* (CUMARU):  
ESTUDOS FARMACOLÓGICOS COM O  
ISOCAMPFERÍDIO E O AMBUROSÍDIO**

**FORTALEZA**

**2006**

Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DO USO MEDICINAL  
DE *Amburana cearensis* (CUMARU): ESTUDOS  
FARMACOLÓGICOS COM O ISOCAMPFERÍDIO E O  
AMBUROSÍDIO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA

2006

Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal

CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DO USO MEDICINAL DE *Amburana cearensis*  
(CUMARU): ESTUDOS FARMACOLÓGICOS COM O ISOCAMPFERÍDIO E O  
AMBUROSÍDIO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 10/03/2006

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Prof. Dr. Antonio José Lapa  
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

---

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães  
Universidade Federal do Ceará – UFC

*Dedico,*

*À DEUS e a MARIA, nossa mãe em CRISTO.*

*A Eles toda a glória, honra e louvor.*

*Obrigada por tantas alegrias.*

*AOS MEUS PAIS*

*Francisco Soares e Gizela Almeida*

*Sempre dedicados a minha formação espiritual e intelectual.*

*Obrigada pelo sorriso e pelo brilho nos olhos a cada conquista.*

*AO MEU MARIDO*

*Giovani Leal*

*Pela cumplicidade, paciência, presença e*

*dedicação a mim e as nossas filhas*

*ÀS MINHAS FILHAS*

*Luana e Letícia*

*Presentes concedidos por Deus nessa vida.*

*À MESTRE*

*Profa. Dra. Glauce Viana,*

*Por me contagiar com seu entusiasmo e alegria pela Pesquisa Científica.*

*..... com muito carinho*

## AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Glauce S. B. Viana**, pela sua orientação, empenho, confiança, paciência e amizade na realização desse trabalho;

Aos **Professores e funcionários do Departamento de Farmácia - UFC**, pela compreensão durante o meu afastamento;

Ao **Prof. Dr. Edilberto Silveira**, um amigo trazido pelos estudos de *A. cearensis*, pelas críticas e o apoio à minha vida profissional;

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos**, pela confiança depositada desde o início dos estudos de *A. cearensis*. Sua amizade e gentilezas são constantes;

Aos **Profs. Drs. Pedro Jorge Caldas Magalhães e Vietla Satyanarayana Rao**, pela doação de seus conhecimentos e pelos incentivos constantes;

Ao **Kirley M Canuto**, parceiro responsável pelos estudos químicos de *A. cearensis*, por seus esforços procurando sempre nos atender a cada solicitação;

Aos queridos bolsistas envolvidos nesse ou em outros projetos: **Fábio Azevedo, Kassiane Costa, Noé Fonseca, Kamyla Fonseca, Viviane Moreira, Melina Fechine, Franciane Vilela, André Barbosa e Cristiane Lucas**, pela dedicação e colaboração inestimáveis, além da agradável relação ensino-aprendizagem;

À **Profa. Dra. Márcia Pitombeira** pela colaboração nas análises histopatológicas;

Ao **Prof. Dr. Osório Viana**, pelo seu bom humor e auxílio na preparação dos artigos;

Aos **Profs. Drs. Andreлина Noronha e Hélio Vieira** que me iniciaram no universo da Pesquisa Científica;

À **Vilani R. Bastos, Juvênia B. Fontenele, Jaqueline Viana e Antonio R. Nava**, amigos sempre presentes, por tudo;

Aos companheiros (as) *Silvânia Vasconcelos, Marta Fonteles, Augusta Ferreira, Cléa Sousa, Vera Lobo, Geanne Cunha, Flávio Maia, Danielle Macedo, Hélio Vitoriano, Cícero Felipe, Lissiana Magna, Gisley, Livia* e a todos os demais que formam o **Laboratório de Neurofarmacologia**, pelo convívio agradável e colaborações em muitos momentos;

Aos Funcionários do Departamento de Farmacologia, *Joana, Aura, Silvia, Marta, Rejane, Ana Eclésia, Patrícia, Vanda, Rose, Íris, “Chiquinho” e Bento*, pela convívio agradável e as gentilezas;

À *Profa. Dra. Nylane Alencar, Dra. Artemísia Portela e Dra. Feb Gemima*, pelo auxílio na aquisição de animais;

A todos que formam o *Laboratório de Produtos Naturais*, em especial a *Profa. Dra. Flávia Almeida Santos*, sempre solícita;

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, particularmente ao amigo *Marcos Antônio M. da Silva e a Dra. Acy Teles Quixadá*; pela viabilização dos estudos com sangue humano;

Ao Laboratório de Oncologia Experimental, em particular aos *Profs. Drs. Manoel Odorico de Moraes Filho, Letícia Veras Costa Lotufo e Cláudia do Ó Pessoa*, pelo apoio nos estudos em células hepáticas;

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), pelo apoio financeiro;

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

## **SER FELIZ**

*Ser feliz não é ter um céu sem tempestades, caminhos sem acidentes, trabalhos sem fadigas, relacionamentos sem decepções.*

*Ser feliz é encontrar força no perdão, esperança nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros.*

*Ser feliz não é apenas valorizar o sorriso, mas refletir sobre a tristeza.*

*Não é apenas comemorar o sucesso, mas aprender lições nos fracassos.*

*Não é apenas ter júbilo nos aplausos, mas encontrar alegria no anonimato.*

*Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver a vida, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.*

*Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar um autor da própria história.*

*É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.*

*Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.*

*É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”.*

*É ter segurança para ouvir uma crítica mesmo que injusta.*

*É beijar os filhos, curtir os pais e ter momentos poéticos com os amigos, mesmo que eles nos magoem.*

*É ter naturalidade para falar “eu errei”.*

*É ter ousadia para dizer, “me perdoe” é ter sensibilidade para expressar “eu preciso de você”.*

*É ter capacidade de dizer “eu te amo”.*

*Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas, usar as lágrimas para irrigar a tolerância;*

*Usar as perdas para refinar a paciência.*

*Usar as falhas para esculpir a serenidade.*

*Usar a dor para lapidar o prazer.*

*Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência.*

*Jamais desista de si mesmo.*

*Jamais desista das pessoas que você ama.*

*Jamais desista de ser feliz, pois a vida é um espetáculo imperdível.*

*E você é um ser humano especial.*

**(autor desconhecido)**

## SUMÁRIO

<b>Lista de Abreviações</b>	12
<b>Lista de Figuras</b>	16
<b>Lista de Tabelas</b>	20
<b>Resumo</b>	21
<b>Abstract</b>	23

## 1. INTRODUÇÃO

1.1. Pesquisa de Plantas Medicinais: inovações tecnológicas e a biodiversidade brasileira	26
1.2. <i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith	27
• Descrição botânica, distribuição geográfica e etnofarmacologia	27
• Composição química de <i>A. cearensis</i>	29
• Toxicologia pré-clínica <i>A. cearensis</i>	30
• Farmacologia pré-clínica <i>A. cearensis</i>	32
1.3. Compostos fenólicos de <i>A. cearensis</i> : isocampferídio e amburosídio A	33
1.4. O Processo Inflamatório	37
• Inflamação e Migração Celular	38
• Leucócitos Polimorfonucleares: neutrófilos	40
• Inflamação e Marcadores Enzimáticos: mieloperoxidase e elastase	41
1.5. Inflamação e Estresse Oxidativo	45
1.6. Músculo Liso das Vias Aéreas	49
1.7. Papel da Inflamação e do Músculo liso das Vias Aéreas na Asma	52
1.8. Farmacoterapia da Asma	55
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	
2.1. Justificativa	58



2.2. Objetivos geral e específicos	60
<b>3. MATERIAS E MÉTODOS</b>	
3.1. Materiais	62
• Material botânico	62
• Isocampferídio e Amburosídio A isolados de <i>A. cearensis</i>	62
• Animais	62
• Sangue humano	62
• Drogas	63
• Composição das Soluções	63
3.2. Métodos	
3.2.1. Estudo Químico - isolamento do isocampferídio e do amburosídio A das cascas do caule de <i>A. cearensis</i>	66
3.2.2. Avaliação dos efeitos gerais - teste hipocrático.	69
3.2.3. Teste de citotoxicidade	69
• Cultura de hepatócitos de ratos	69
• Isolamento de Hepatócitos.	69
• Condições de cultivo.	70
• Teste do MTT	70
3.2.4. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelos experimentais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	71
• Edema de pata induzido por carragenina em ratos	71
• Edema de pata induzido por dextrano, prostaglandina E <sub>2</sub> , histamina, serotonina ou bradicinina em camundongos	71
• Aumento da permeabilidade vascular induzida por dextrano em pata de camundongos	72
• Peritonite induzida por carragenina ou N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina	72

(fMLP) em camundongos	
• Efeito do ICPF e do AMB sobre a desgranulação leucocitária, mensurado pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase	73
3.2.5. Hepatotoxicidade e estresse oxidativo induzido por CCL <sub>4</sub> em ratos	74
• Avaliação da Função Hepática: Alanina Transaminase (ALT) e Aspartato transaminase (AST)	74
• Análise Histopatológica	75
• Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático – dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	75
• Dosagem de catalase no fígado	75
• Dosagem de Glutathione Reduzida (GSH) – determinação de grupos sulfidrílicos (-SH) não protéicos.	76
• Determinação do conteúdo de proteína.	76
3.2.6. Avaliação do efeito do ICPF sobre contratilidade da musculatura lisa traqueal de cobaia	76
3.2.7. Análise estatística	78
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Avaliação preliminar das toxicidades do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de <i>Amburana cearensis</i> A.C. Smith	80
• Efeitos gerais do ICPF e do AMB - teste hipocrático em camundongos	80
• Avaliação das citotoxicidades do ICPF e do AMB em hepatócitos de ratos.	80
4.2. Determinação das atividades antiinflamatórias do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de <i>A. cearensis</i> A.C. Smith	82
• Edema de pata induzido por Carragenina	82
• Edema de pata induzido por dextrano	82
• Edema de pata induzido por prostaglandina E <sub>2</sub> , histamina, serotonina e bradicinina	89

4.2.3. Peritonite induzida por carragenina ou fMLP em camundongos	92
4.2.4. Efeito do ICPF e do AMB na desgranulação de neutrófilos induzida pelo fMLP em sangue humano: atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase	98
4.3. Avaliação das atividades hepatoprotetora e antioxidante do amburosídio A (AMB) isolado de <i>A. cearensis</i> A.C. Smith na hepatotoxicidade induzida pelo CCl <sub>4</sub> em ratos	98
• Determinação do efeito do amburosídio A sobre os níveis séricos das enzimas transaminases (ALT/TGP e AST/TGO)	102
• Determinação do efeito do amburosídio A sobre a peroxidação lipídica	102
• Determinação do efeito sobre os níveis de glutatona reduzida	102
• Determinação do efeito do amburosídio A sobre a atividade da Catalase	106
• Análise histopatológica do fígado de animais submetidos ao tratamento com amburosídio A	106
4.4. Avaliação do efeito do ICPF e do AMB sobre a contratilidade da musculatura lisa traqueal de cobaia	106
<b>5. DISCUSSÃO</b>	123
<b>6. CONCLUSÕES</b>	141
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	144
<b>8. PUBLICAÇÕES</b>	176

## LISTA DE ABREVIÇÕES

<b>ALT/TGP</b>	alanina transaminase/transaminase glutâmica pirúvica
<b>AMB</b>	amburosídeo A
<b>AMPc</b>	adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<b>4-AP</b>	4-aminopiridina
<b>AP-1</b>	proteína ativadora-1
<b>AST/TGO</b>	aspartato transaminase/transaminase glutâmico oxalacética
<b>Boc-Ala-OphNO<sub>2</sub></b>	n-t-butoxicarbonil-l-alanina-p-nitrofeniléster
<b>CCh</b>	carbacol
<b>CCl<sub>4</sub></b>	tetracloroeto de carbono
<b>CE<sub>50</sub></b>	concentração efetiva equivalente a 50% da resposta máxima
<b>CEPA</b>	comissão de ética e pesquisa animal
<b>Cg</b>	carragenina
<b>ChTX</b>	charibidotoxina
<b>CLAE/UV</b>	cromatografia líquida de alta eficiência/detector ultra violeta
<b>COBEA</b>	colégio brasileiro de experimentação animal
<b>COX</b>	ciclooxigenase
<b>CYP2A6</b>	isoforma da enzima citocromo p450
<b>DAG</b>	diacilglicerol
<b>DEXA</b>	dexametasona
<b>DL50</b>	dose letal para 50% dos animais
<b>D-MEM</b>	meio eagle Dulbecco's modificado
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DPOC</b>	doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>DSF</b>	desferrioxamina
<b>DTNB</b>	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

<b>Dx</b>	dextrano
<b>ECA</b>	enzima conversora de angiotensina
<b>EDTA</b>	etilenodiaminotetracético
<b>EHA</b>	extrato hidroalcoólico
<b>fMLP</b>	n-formil-metil-leucil-fenilalanina
<b>FPR</b>	receptor peptídico formil
<b>Gc</b>	guanilato ciclase
<b>Glib</b>	glibenclamida
<b>GM-CSF</b>	fator alfa de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos
<b>GMPc</b>	guanosina 3',5' - monofosfato cíclico
<b>GSH</b>	glutationa reduzida
<b>γ-GCS-HS</b>	gama-glutamil cisteína sintetase
<b>GPx</b>	glutationa peroxidase
<b>GSSG-RD</b>	glutationa redutase
<b>GSSG</b>	glutationa oxidada
<b>HBSS</b>	solução salina de Hanks
<b>HE</b>	hematoxilina-eosina
<b>IbTX</b>	iberiotoxina
<b>ICAM-1</b>	molécula de adesão intercelular-1
<b>ICPF</b>	isocampferídio
<b>IgE</b>	imunoglobulina E
<b>IκB</b>	proteína inibidora do NF-κB
<b>IL</b>	interleucina
<b>INDO</b>	indometacina
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol trifosfato
<b>IUCN</b>	união internacional para conservação da natureza

<b>KCl</b>	cloreto de potássio
<b>LDH</b>	lactato desidrogenase
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-argenina metil éster
<b>LPS</b>	lipopolissacarídeo
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>MAP</b>	proteína ativada por mitógeno
<b>MAPK</b>	(proteína ativada por mitógeno) quinase
<b>MCP-1</b>	proteína quimioatraente de monócitos - 1
<b>MDA</b>	malonildialdeído
<b>MDH</b>	malato desidrogenase
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	proteína inflamatória do macrófago-1 $\alpha$
<b>MPO</b>	mieloperoxidase
<b>MTT</b>	brometo 3[4,5dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
<b>NAC</b>	n-acetil-l-cisteína
<b>NADPH</b>	nicotinamida adenina dinuclotídio - p reduzido
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	fator nuclear kappa b
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	ânion superóxido
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4]oxadiazolol [4,3-a] quinoxalin-1-one
<b>OmpA</b>	<i>outer membrane protein A</i>
<b>ON</b>	óxido nítrico
<b>ONS</b>	óxido nítrico sintase
<b>PAF</b>	fator ativador de plaquetas
<b>PBS</b>	solução salina tamponada com fosfato ( <i>phosphate buffer solution</i> )

<b>PDE</b>	Fosfodiesterase
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>PIP<sub>2</sub></b>	fosfatidilinositol-4,5-difosfato
<b>PKC</b>	proteína quinase C
<b>PKG</b>	proteína quinase G
<b>PLC</b>	fosfolipase C
<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares
<b>RAI</b>	resposta alérgica inicial
<b>RAT</b>	resposta alérgica tardia
<b>RANTES</b>	regulada por meio de ativação expressa e secretada por células T normais
<b>RNS</b>	espécies reativas de nitrogênio
<b>ROS</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>SARA</b>	síndrome da angústia respiratória aguda
<b>SBF</b>	soro bovino fetal
<b>SOD</b>	superóxido-dismutase
<b>SOD-Mn</b>	superóxido-manganês
<b>SPLI</b>	inibidor de secreção de leucoprotease
<b>TBARS</b>	espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	fator de crescimento transformador $\beta$
<b>TMB</b>	3, 3',3, 5'-tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão da célula vascular - 1

## LISTA DE FIGURAS

1	<i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith	28
2	Metabólitos secundários obtidos das cascas do caule de <i>A. cearensis</i> .	31
3	Estrutura química de algumas classes de flavonóides	35
4	Migração quimiotática de neutrófilos através de um gradiente de quimiocinas até o sítio de inflamação ou infecção	39
5	Estimulação de neutrófilos.	41
6	Formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio a partir de reações com o HOCl, produto da enzima mieloperoxidase.	43
7	Representação esquemática da geração de ROS e suas dismutações.	47
8	Ativação de fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1 por oxidantes, estímulos ambientais e/ou citocinas alteram os níveis de GSH/GSSG que levam a indução de genes pró-inflamatórios e antiinflamatórios em células pulmonares.	48
9	Resposta Alérgica Inicial (EAR), Tardia (LAR) e Remodelamento das Vias Aéreas na Asma	54
10	Esquema de fracionamento do extrato etanólico de <i>Amburana cearensis</i> para o isolamento do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB)	67
11	Avaliação da citotoxicidade do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) em hepatócitos de ratos.	81
12	Atividade antiedematogênica do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.	83
13a-c	Micrografia ilustrando os efeitos do isocampferídio (ICPF), amburosídio (AMB) e indometacina (INDO) sobre o edema de pata induzido por carragenina (Cg) em ratos.	84
14	Avaliação morfométrica do exsudato induzido por carragenina (Cg) na pata de rato, considerando o efeito do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) e indometacina.	87
15	Efeito do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata (A) e o	



	extravasamento vascular (B) induzidos por dextrano em camundongos.	88
16	Efeito do isocampferídio (ICPF) sobre o edema (A) e o extravasamento vascular (B) induzidos por dextrano em camundongos.	90
17	Atividade antiedematogênica do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata induzido por prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ) em camundongos.	91
18	Atividades antiedematogênicas do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de <i>Amburana cearensis</i> sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos.	93
19	Atividades antiedematogênicas do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos	94
20	Avaliação dos efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata induzido por bradicinina em camundongos.	95
21	Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) na migração de leucócitos induzida por carragenina (Cg) na cavidade peritoneal de camundongos.	96
22	Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) na migração de leucócitos induzida por fMLP na cavidade peritoneal de camundongos.	97
23	Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) na degranulação de neutrófilos humano estimulados pelo fMLP, determinados pela atividade da mieloperoxidase (MPO).	99
24	Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) na degranulação de neutrófilos humano estimulados pelo fMLP, determinados pela atividade da elastase.	100
25	Avaliação da citotoxicidade do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) em neutrófilos isolados de sangue humano.	101
26	Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a peroxidação lipídica, detreminada pelos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico-TBARS em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ).	104
27	Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a redução no nível de glutaciona	105

	reduzida (GSH) induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ) em fígado de ratos	
<b>28</b>	Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> )	107
<b>29a,b</b>	Fotomicrografia ilustrando o efeito do amburosídio A (AMB) sobre a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ) em ratos	108
<b>30</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF), teofilina ou veículo (solução aquosa de Tween 80: 0,0024 – 0,24%) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh)	110
<b>31</b>	Fotomicrografia ilustrando a traquéia de cobaia com (A) e sem epitélio (B). Curva concentração-resposta relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia com ou sem epitélio pré-contraída por carbacol (CCh)	113
<b>32</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do amburosídio A (AMB) em traquéia com ou sem epitélio pré-contraída por carbacol (CCh)	114
<b>33</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia com epitélio isolada de cobaia e pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do L-NAME (100 µM)	115
<b>34</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia sem epitélio e pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do L-NAME (100 µM)	116
<b>35</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) na traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do ODQ	117
<b>36</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por KCl (40 ou 120 mM) na ausência ou na presença da glibenclamida (Glib, 33 µM)	119
<b>37</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) na traquéia isolada de cobaia pré-contraída por KCl (40 mM) em ausência (controle) ou na presença da iberiotoxina (IbTX, 0,1 µM) ou 4-aminopiridina (4-AP, 100 µM)	120
<b>38</b>	Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF)	121

- em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do propranolol (1  $\mu$ M)
- 39** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) 122  
em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença da capsaicina (3  $\mu$ M)
- 40** Proposta para o mecanismo de ação relaxante muscular do isocampferídio 139  
(ICPF) em traquéia isolada de cobaia.
- 41** Possíveis sítios de ações do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A 140  
(AMB) isolados de *A. cearensis* na asma

## LISTA DE TABELAS

1	Principais canais de potássio presentes nas vias aéreas	52
2	Solução salina tamponada com fosfato (PBS)	63
3	Solução de Turk	63
4	Solução de Albumina 3%	64
5	Tampão HBSS (Solução Salina de Hanks)	64
6	Tampão HBSS modificado	64
7	Tampão HBSS modificado concentrado	65
8	Solução de Krebs-Henseleit concentrada	65
9	Objetivos e métodos empregados nos estudos toxicológico e farmacológico do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados das cascas do caule de <i>A. cearensis</i>	68
10	Efeito do amburosídio A (AMB) sobre os níveis séricos das enzimas transaminases, ALT/TGP e AST/TGO, em ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> )	103
11	CE50 obtida da curva concentração-resposta do efeito relaxante do ICPF ou AMB em traquéia de cobaia pré-contraída pelo carbacol (CCh) ou potássio (KCl)	112

## RESUMO

CONTRIBUIÇÃO PARA A VALIDAÇÃO DO USO MEDICINAL DE *Amburana cearensis* (CUMARU): ESTUDOS FARMACOLÓGICOS COM O ISOCAMPFERÍDIO E O AMBUROSÍDIO. Aluna: Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, 2006.

*Amburana cearensis* (Fabaceae) é uma árvore da caatinga nordestina, mais conhecida popularmente como cumaru. Suas cascas (caule) possuem um cheiro característico pela presença de cumarina, e são principalmente utilizadas no tratamento da bronquite, tosse e asma. O presente estudo procurou investigar os efeitos tóxicos e as atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular do isocampferídio (ICPF, 3-metilflavonol) e/ou do amburosídeo A (AMB, glucosídeo fenólico) isolados das cascas do caule de *A. cearensis*. A administração intraperitoneal (i.p.) do ICPF ou do AMB em dose única (50 – 200 mg/kg) mostrou baixa toxicidade em camundongos. Na cultura primária de hepatócitos apenas o ICPF (100 µg/ml) reduziu significativamente a viabilidade celular, determinada pelo teste do MTT. O ICPF e o AMB (12,5 – 50 mg/kg, i.p.) apresentaram atividade antiinflamatória, observada inicialmente pela inibição do edema de pata induzido por carragenina-Cg, prostaglandina E<sub>2</sub>, dextrano-Dx, histamina ou serotonina e pela redução em 39 e 50% respectivamente do infiltrado de neutrófilos verificada pela análise histopatológica/morfométrica do edema induzido por Cg. O aumento da permeabilidade vascular induzido pelo Dx em camundongos, foi também significativamente inibido pelo ICPF ou AMB. O pré-tratamento (oral ou i.p.) dos animais com ICPF ou AMB (25 e 50 mg/kg) causaram reduções tanto na migração de leucócitos quanto neutrófilos induzida por Cg ou fMLP no peritônio de camundongos. O ICPF e o AMB preveniram parcialmente a degranulação de neutrófilos humano induzida pelo fMLP, determinada pela redução das atividades das enzimas mieloperoxidase e elastase em até 66 e 52% respectivamente. Os compostos fenólicos em estudo não foram citotóxicos para neutrófilos (teste do MTT). O AMB mostrou uma ação hepatoprotetora/antioxidante no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> em ratos, determinada pelas enzimas hepáticas (ALT e AST) e pela catalase, além de TBARS, glutatona reduzida e análise histopatológica. Na traquéia isolada de cobaia o ICPF (10 – 1000 µM) e o AMB (10 – 3000 µM) relaxaram de maneira concentração-dependente o músculo pré-contraído pelo CCh ou

KCl. A remoção do epitélio traqueal favoreceu o efeito relaxante do ICPF, mas não modificou o efeito do AMB. O relaxamento induzido pelo ICPF foi inibido em 41% pelo L-NAME; 31 e 50% pelo ODQ (3 e 33  $\mu$ M); 31 % pelo propranolol e 37 % pela capsaicina. Na traquéia pré-contraída pelo KCl (40 mM) a glibenclamida (GLB) ou iberiotoxina reduziram o efeito relaxante do ICPF, enquanto no músculo pré-contraído pelo KCL 120 mM o efeito do ICPF foi reduzido e não foi afetado pela GLB. Portanto, os resultados apresentados mostram que o ICPF e o AMB possuem atividades antiinflamatória, relaxante muscular e antioxidante, o que justifica pelo menos em parte o uso tradicional de *A. cearensis* no tratamento de doenças respiratórias onde as características fisiopatológicas incluem inflamação, estresse oxidativo e broncoconstrição.

Palavras-chave: *Amburana cearensis*, isocampferídio, amburosídio A, atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular.

## ABSTRACT

CONTRIBUTION TO THE VALIDATION OF THE MEDICINAL USE OF *Amburana cearensis* (CUMARU): PHARMACOLOGICAL STUDIES WITH ISOKAEMPFERIDE AND AMBUROSIDE. Author: Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal. Advisor: Prof. Dr. Glauce Socorro de Barros Viana. Doctoral Thesis. Program of Pos-Graduate in Pharmacology. Departament de Physiology and Pharmacology. Federal University of Ceará, 2006.

*Amburana cearensis* is a medicinal plant from Northeast Brazil popularly known as “cumaru”. Its stem bark has an odor characteristic of the presence of coumarin, being used in alternative medicine for the treatment of bronchitis and asthma. The present study investigated the toxicity, as well as the anti-inflammatory, antioxidant and smooth muscle relaxant activities of isokaempferide (IKPF, 3-methylflavonol) and amburoside A (AMB, phenolic glucoside), bioactive constituents of the plant. The intraperitoneal administration (ip) of IKPF or AMB, in single doses (50-200 mg/kg), showed low toxicity in mice. In primary hepatocyte cultures, only IKPF (100 µg/ml) reduced significantly the cellular viability, as assessed by the MTT test. ICPF and AMB (12.5- 50 mg/kg, ip) presented anti-inflammatory activities, observed initially by inhibitions of the carrageenan (Cg), prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), dextran (Dx), histamine or serotonin-induced paw edemas. Besides, IKPF and AMB (12.5 – 50 mg/kg) produced 39 and 50% reductions, respectively, of neutrophil migration as assessed by histopathological/morphometric analyses of the Cg-induced paw edema. The increase of vascular permeability induced by Dx in mice was also significantly inhibited by IKPF or AMB. Mice pretreatments (oral or ip) with IKPF or AMB (25 and 50 mg/kg) reduced peritoneal Cg or fMLP-induced leucocytes and neutrophil migrations. Also, IKPF and AMB partially prevented fMLP-induced neutrophil degranulation in human blood, as determined by the decrease in 66 and 52% of activities of the enzymes myeloperoxidase and elastase, respectively. The two compounds were not cytotoxic for neutrophil, as assessed by the MTT test. AMB showed hepatoprotective and antioxidant actions in the model of CCl<sub>4</sub>-induced liver toxicity in rats, as determined by the liver enzymes activity (AST and ALT), catalase, lipoperoxidation (TBARS assay), reduced glutathione, and histological analysis. In the isolated guinea pig trachea, IKPF (10-1000 µg/ml) and AMB (10- 3000 µg/ml) produced a concentration-dependent relaxation of the muscle precontracted by carbachol or KCl. The epithelium removal improved IKPF-induced relaxation, but did not alter the AMB effect. IKPF-induced relaxation was inhibited in 41% by L-NAME; 31 and 50% by ODQ (3 and 33

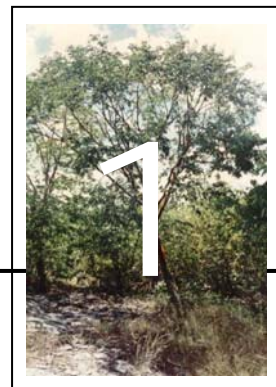
$\mu\text{M}$ ); 31% by propranolol and 37% by capsaicin. In the trachea pre-contracted by KCl (40 mM), the pre-incubation with glibenclamide or iberiotoxin, inhibited the IKPF-induced relaxation by 39% and 38%, respectively. On the other hand, 4-aminopyridine did not significantly influence the effect of IKPF. However, in the muscle pre-contracted with 120mM KCl the relaxant effect of IKPF was significantly reduced and not affected by glibenclamide. In conclusion, results showed that IKPF and AMB present anti-inflammatory, muscular relaxant and/or antioxidant activities, justifying the traditional use of *Amburana cearensis* in the treatment of respiratory tract diseases that present inflammation, oxidative stress, and bronchoconstriction as pathophysiological characteristics.

Keywords: *Amburana cearensis*, isokaempferide, amburoside A, antiinflammatory, antioxidant and muscle relaxant activities.



# INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Pesquisa de Plantas Medicinais: inovações tecnológicas e a biodiversidade brasileira

Dos primórdios das civilizações até o fim do século XIX, as plantas medicinais constituíram a principal fonte de medicamentos, o que pode ser ilustrado por algumas farmacopéias, como a Farmacopéia Geral para o Reino e Domínio de Portugal (1794), onde constam 400 espécies vegetais. Desde então a importância relativa dos produtos naturais tem oscilado de acordo com as estratégias de grandes companhias farmacêuticas (SCHENKEL et al., 2000; SEIDL, 2002).

Embora existam muitas substâncias sintéticas bioativas novas e as técnicas combinatórias tenham expandido consideravelmente o número de substâncias disponíveis para testes biológicos, existe ainda um grande número de produtos naturais no mercado farmacêutico (SEIDL, 1999). Nos últimos anos muitas das desvantagens apontadas para a busca de novos fármacos a partir de produtos naturais estão sendo ultrapassadas através da aplicação de novas tecnologias úteis, por exemplo, no isolamento e elucidação estrutural de substâncias e no desenvolvimento de métodos de *screening* farmacológico. Além disso, o uso de técnicas cromatográficas combinadas, tais como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Ultra Violeta (CLAE/UV), criaram novas possibilidades analíticas na padronização de amostras complexas como os extratos vegetais (SCHENKEL et al., 2000).

O Brasil é constituído por vários biomas, possui uma diversidade de solos e climas que certamente favorecem a riqueza e variedade de tipos de vegetação distribuídos em seus diversos ecossistemas (CORDELL, 2000). Assim, a biodiversidade brasileira, somada ao expressivo conhecimento etnofarmacológico oriundo da miscigenação da população constituem uma vantagem importante no processo de desenvolvimento de programas e projetos com plantas medicinais que visam o fortalecimento do país na área e o aproveitamento deste recurso de maneira sustentável (SILVA et al., 2001). Há, entretanto circunstâncias novas que devem ser levadas em consideração, como a existência de um conjunto de normas (Medida Provisória Nº 2186-16, 2001; Ministério do Meio Ambiente-IBAMA) destinadas ao controle do acesso à biodiversidade e às informações tradicionais. Inclusive, recentemente foi publicado o Decreto 5459 de 07.06.2005; Presidência da República - Casa Civil, que disciplina as sanções aplicáveis ao não atendimento das normas legais, que pode ser tratado como caso de “biopirataria”.

No Ceará, há quase 30 anos pesquisadores têm se dedicado ao estudo multidisciplinar da flora medicinal do Nordeste. Desse esforço já foram gerados inúmeros projetos (ex.:

projeto Farmácias Vivas), solicitações de patentes e trabalhos publicados. Nesse processo algumas espécies vegetais foram ou continuam sendo objetos de estudos, tais como *Amburana cearensis* A. C. Smith, além de outras não menos importantes incluindo *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Cissus sicyoides* L., *Justicia pectoralis* var *stenophylla* Leon e *Curcuma longa* L.

## 1.2. *Amburana cearensis* A. C. Smith

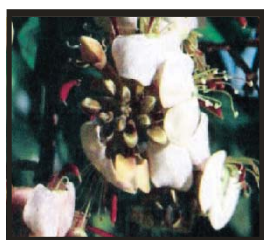
- **Descrição botânica, distribuição geográfica e etnofarmacologia**

*Amburana cearensis* (Allemão) A. C. Smith (syn. *Torresea cearensis* Allemão), Leguminosae-Papilionoideae (Fabaceae), é conhecida popularmente no Brasil como cumaru, amburana, amburana de cheiro, cerejeira, cerejeira-rajada, cumuru-do-Ceará, cumaré, cumarudas-caatingas, cumaru-de-cheiro, imburana, imburana-de-cheiro e umburana. Na Argentina é popularmente conhecida como palo trebol e roble (BRAGA 1976, LORENZI, 1992; LORENZI & MATOS, 2002).

É uma árvore com até 20 m de altura (**Figura 1**) de tronco revestido por uma casca espessa (ritidoma esfoliativo) que se desprende em finas lâminas delgadas deixando grandes manchas vermelho-pardas de mistura com outras esverdeadas. As cascas do caule possuem um cheiro característico, pela presença de cumarina, o que facilita a identificação da espécie. Suas folhas são compostas pinadas, de folíolos elípticos, orbiculares até oblongo ou obovais, de 2-3 cm de comprimento. Os frutos tipo vagem tardiamente deiscentes, contém uma única semente achatada e provida de uma asa membranácea. No Brasil, ocorre do Nordeste até as regiões mais áridas de São Paulo. Na região amazônica, principalmente no Acre e Rondônia ocorre outra espécie afim desta planta – *Amburana acreana* (Ducke) A. C. Smith (BRAGA 1976; LORENZI & MATOS, 2002). Além da Argentina, *Amburana cearensis* é encontrada também na Bolívia (LEITE, 2005).

*Amburana cearensis* raramente forma populações densas em ambientes florestais, sendo encontrada normalmente compondo a vegetação de fazendas. Além disso, parece existir uma variabilidade genética na espécie, embora não tenha sido ainda definido em que pontos ocorrem tais diferenças (LEITE, 2005).

As cascas do caule bem como as sementes do cumaru são tradicionalmente utilizadas sob a forma de chá como antiinflamatória, espasmolítica e principalmente no tratamento da asma, tosse e bronquite. As sementes são usadas, também, como aromatizante em substituição à fava-tonka, *Dipteryx odorata* (LORENZI & MATOS, 2002; CORREA,



**Figura 1.** *Amburana cearensis* A. C. Smith. (fotos: A. G. LEAL; E. R. SILVEIRA; LORENZI & MATOS, 2002).

1984). Na Bolívia um grupo étnico, Chacobo, que vive numa região endêmica de malária utiliza *A. cearensis* no tratamento da febre (GIMENEZ et al., 1996). As espécies do gênero *Amburana*, *A. cearensis* e *A. acreana*, têm ainda importância econômica pela qualidade da sua madeira explorada industrialmente na fabricação de móveis (KILLEEN, 1993).

*A. cearensis* tem sido identificada como uma espécie sob risco de extinção pela União Internacional para Conservação da Natureza – IUCN (American Regional Workshop, 1996; LEITE, 2005), o que justifica o nosso interesse em estabelecer uma fonte alternativa, espécie cultivada, para complementar a fonte silvestre, ou até mesmo substituí-la. Para tanto, temos realizado estudos multidisciplinares (agronomia, química e farmacologia) com espécimes cultivadas por 2 a 9 meses de desenvolvimento (CANUTO et al., 2004; LEAL et al., 2004).



Foto: cumaru cultivado

- **Composição química de *A. cearensis***

Estudo fitoquímico das sementes revelou que possuem aproximadamente 23 % de óleo fixo constituído principalmente do glicerídeo dos ácidos: palmítico (18,6%), linoléico (7,1 %), oléico (53,1 %) e esteárico (8,0 %), além de 4 % de cumarina e um pouco de umbeliferona (SOUSA et al., 1991; MORS & RIZZINI, 2000).

Das cascas do caule da planta coletada no município de Quixeramobim-CE, foram isoladas várias substâncias, incluindo cumarina (1,2-benzopirona), isocampferídio (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-metoxi), fisetina (3,5,3',4'-tetrahidroxi-flanona), alfalona (6-hidroxi-4',7-dimetoxiisoflavona) e o glucosídeo fenólico, amburosídeo A (4-(O-β-D-glucopiranosil)-hidroxi-7-(3',4'-dihidroxi-benzoil)-benzilálcool) (CANUTO, 2002). Das cascas do caule do cumaru coletado na Bolívia, Bravo et al. (1999) isolaram além da cumarina os amburosídeo A e B (4-(O-β-D-glucopiranosil)-hidroxi-7-(3'-metoxi-,4'-hidroxi-benzoil)-benzil álcool) (**Figura 2**). Dentre esses compostos serão investigados no presente estudo o isocampferídio e o amburosídeo A.. O isocampferídio foi selecionado por ser o derivado flavônico majoritário (0,07 %) na planta, além de compor a fração flavonóide bioativa (LEAL et al., 2003a), enquanto, o amburosídeo A (0,3 %) ao lado da cumarina (0,2 %) está entre os compostos bioativos majoritários presentes nas cascas do caule do cumaru (CANUTO et al., 2002; 2004).

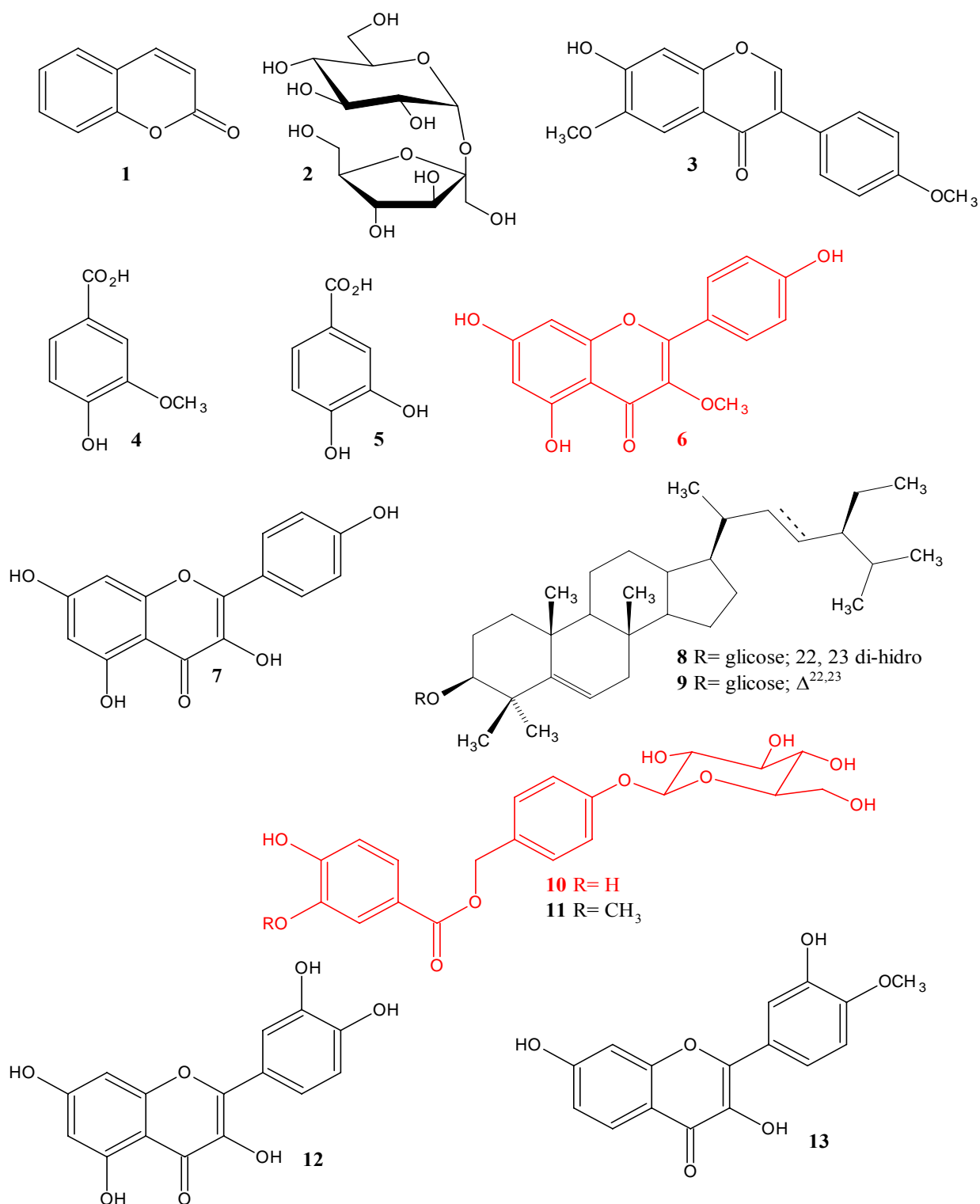
- **Toxicologia pré-clínica de *A. cearensis***

O estudo toxicológico agudo do extrato hidroalcoólico (EHA) das cascas do caule do cumaru administrado por via oral (v.o.) em ratos revelou a baixa toxicidade da planta; tendo sido observadas mortes apenas pela administração por via intraperitoneal (i.p.), cuja DL50 foi de  $1.79 \pm 0.12$  g/Kg. Na avaliação toxicológica sub-crônica nenhum efeito tóxico significativo ou morte foi observado, embora o EHA (500 mg/kg, v.o.) administrado diariamente durante 4 semanas, tenha causado um aumento nos níveis da alanina transaminase - ALT. Foi observado também em ratos um aumento no número de neutrófilos, estando possivelmente relacionado a algum processo inflamatório agudo adquirido pelos animais durante o período de tratamento (LEAL et al., 2003b). A presença de cumarina na planta possivelmente contribui para o aumento no nível de ALT observado nos animais tratados com EHA. Isso, considerando que estudos anteriores (CARLTON et al., 1996; LAKE, 1999; COHEN, 1979) têm mostrado que altas doses de cumarina produzem lesões hepáticas em roedores.

A cumarina é um composto orgânico heterocíclico, aromático, encontrada em várias espécies vegetais e foi isolada pela primeira vez de *Dipteryx odorata* (fava-tonka), espécie denominada anteriormente *Coumarouna odorata*, daí o termo cumarina (FEUER, 1974). De acordo com a espécie animal envolvida a cumarina apresenta diferenças quanto ao seu metabolismo e ao grau de hepatotoxicidade (COHEN, 1979; LAKE, 1999). No homem a 7-hidroxilação realizada pela CYP2A6, isoforma da enzima citocromo P-450, é a principal via de biotransformação da cumarina no fígado, enquanto em outras espécies tais como ratos esta é uma via secundária (GANGOLLI et al., 1974; LAKE, 1999; SHILLING et al., 1969). No rato a hepatotoxicidade induzida pela cumarina está associada com o seu metabolismo, que tem como produto intermediário um composto instável, 3,4-epóxido cumarina, que transforma-se no ácido o-hidroxifenilacético, produto principal do metabolismo hepático (BORN et al., 2000).

Há registro apenas de um caso de hepatotoxicidade induzida pela cumarina no homem. Ocorreu com uma paciente de 33 anos com síndrome de Turner, após tratamento durante 8 semanas com um produto contendo cumarina. A função hepática retornou ao normal duas semanas após a interrupção do tratamento (FAURSCHOU, 1982).

Em estudo anterior (LEAL et al., 2000) demonstramos que o EHA (500 mg/kg, v.o.) administrado diariamente durante 50 dias em ratas, não interferiu com a gestação nem com o desenvolvimento da primeira e segunda geração dos animais Estudos (STRUWE et al.,



**Figura 2.** Metabólitos secundários obtidos das cascas do caule de *A. cearensis*. **1.** Cumarina , **2.** sacarose, **3.** afformosina, **4.** ácido vanílico , **5.** ácido protocatecuico, **6.** isocampferídio, **7.** campferol, **8.**  $\beta$ -sitosterol glicosilado, **9.** estigmasterol glicosilado, **10.** amburosídio A, **11.** amburosídio B, **12.** quercetina, **13.** 4'-metoxifisetina (CANUTO, 2002). Os constituintes em vermelho foram investigados no presente estudo.

1984; ZIPPRICH et al., 1987; GARTNER et al., 1993) revelaram que a terapia anticoagulante com derivados cumarínicos (4-hidroxicumarina), warfarin e dicumarol, durante o início da gravidez pode causar malformações. Contudo, é importante registrar que a cumarina (1,2-benzopirona) presente no cumaru não é um derivado da 4-hidroxicumarina, classe conhecida por sua atividade anticoagulante (FEUER, 1974).

- **Farmacologia pré-clínica de *A. cearensis* e constituintes químicos**

Em estudos anteriores (LEAL, 1995; LEAL et al., 1997) demonstramos que o EHA e a cumarina administrados por via oral possuem atividade antinociceptiva determinada através dos modelos de contorções abdominais induzida pelo ácido acético, teste da formalina e placa quente em camundongos. O efeito antinociceptivo da cumarina ocorreu por mecanismos independentes da ativação de receptores opióides, enquanto, o óxido nítrico se mostrou importante na antinocicepção induzida pela cumarina.

O EHA e a cumarina administrados por via oral, possuem atividades antiedematogênicas observadas no edema de pata induzido pela carragenina (LEAL et al., 1997). Além disso, o EHA, a cumarina e a fração flavonóide obtidos das cascas do caule de *A. cearensis*, bloquearam a migração de leucócitos induzida por carragenina ou N-formil-metil-leucil-fenilalanina - fMLP em ratos (LEAL et al., 2003a). A migração celular induzida por carragenina é dependente da liberação de agentes quimiotáticos pelas células residentes (SOUZA et al., 1988), enquanto o fMLP é um quimiotático direto (CYBULSKY et al., 1989). Assim, é possível que o efeito inibitório do EHA, da cumarina e da fração flavonóide ocorra por uma inibição na liberação de substâncias quimiotáticas, como LTB<sub>4</sub> e IL-8 de macrófagos, ou por interferir em alguma etapa da migração celular. O EHA, a cumarina e a fração flavonóide foram capazes também de inibir o aumento da permeabilidade vascular induzida pela serotonina ou histamina em ratos.

Tanaka et al. (1997) purificaram das sementes de *A. cearensis* um inibidor de tripsina tipo Bowman-Birk, que prolonga o tempo de coagulação sanguínea via inibição do fator XIIIa. Mais recentemente, Trevisan & Macedo (2003) mostraram que o extrato etanólico das cascas do caule de *A. cearensis* inibiu em 100 % a atividade da enzima colinesterase.

Além de *A. cearensis* a cumarina é encontrada também em outras espécies, como *Justicia pectoralis* Jacq., *Eclipta alba* Hassk, *Pterodon polygaliflorus* Bent e *Hybanthus ipecacuanha* Benth., encontradas na região nordeste do Brasil onde são utilizadas tradicionalmente no tratamento de doenças respiratórias (BRAGA, 1976; CORREA, 1984; antinociceptiva, antiinflamatória e broncodilatadora em roedores (LEAL et al., 2000).



As cumarinas possuem inúmeras propriedades farmacológicas descritas na literatura, incluindo atividades antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral, antitrombótica, antimutagênica e vasodilatadora (HOULT et al., 1996, PAYA et al., 1992). A cumarina (1,2-benzopirona) tem sido indicada no tratamento de pacientes com linfedema, isso por sua capacidade de aumentar a ação proteolítica de macrófagos (PILLER, 1976; CLODIUS & PILLER, 1978).

Recentemente Cheng et al (2004) mostraram a bioatividade de uma série de cumarinas e sua estreita relação estrutura-atividade inibitória sobre a produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, segundo HAN et al. (2005) derivados cumarínicos naturais ou sintéticos com atividade anti-câncer e antiinflamatória podem possivelmente exercer suas funções biológicas através da inibição da ativação de quinases, como a MEK1.

Na avaliação do efeito do EHA e constituintes químicos de *A. cearensis* sobre a contratilidade muscular lisa, o EHA e a cumarina inibiram de maneira concentração-dependente, a contração induzida por adrenalina, acetilcolina ou cloreto de bário em ducto deferente isolado de ratos. Na traquéia isolada de cobaia, o EHA, a cumarina e a fração flavonóide foram capazes de relaxar o músculo pré-contraído tanto por carbacol, quanto por histamina ou KCl. A cumarina mostrou-se mais potente, seguida pela fração flavonóide e pelo EHA (LEAL et al., 2003a).

As atividades antinociceptiva, antiinflamatória e relaxante muscular determinadas para o extrato das cascas do caule do cumaru, estão possivelmente relacionadas não só com a presença da cumarina na planta, mas também de outras substâncias como os compostos fenólicos, incluindo flavonóides e glucosídeos fenólicos.

### **1.3. Compostos fenólicos de *A. cearensis*: isocampferídio e amburosídio A**

Estudos (FRANKEL et al, 1996; PIZZALE et al., 2002; SKERGET et al., 2005) têm demonstrado que boa parte das ações biológicas determinadas em espécies vegetais estão relacionadas principalmente à presença de compostos fenólicos na planta.

Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade estrutural, com moléculas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático ao qual está ligado pelo menos um grupamento hidroxila, livre ou ligado com outras funções, tais como éster, éter e glicosídeo (BRUNETON, 1999).

A origem dos metabólitos secundários nas plantas pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos

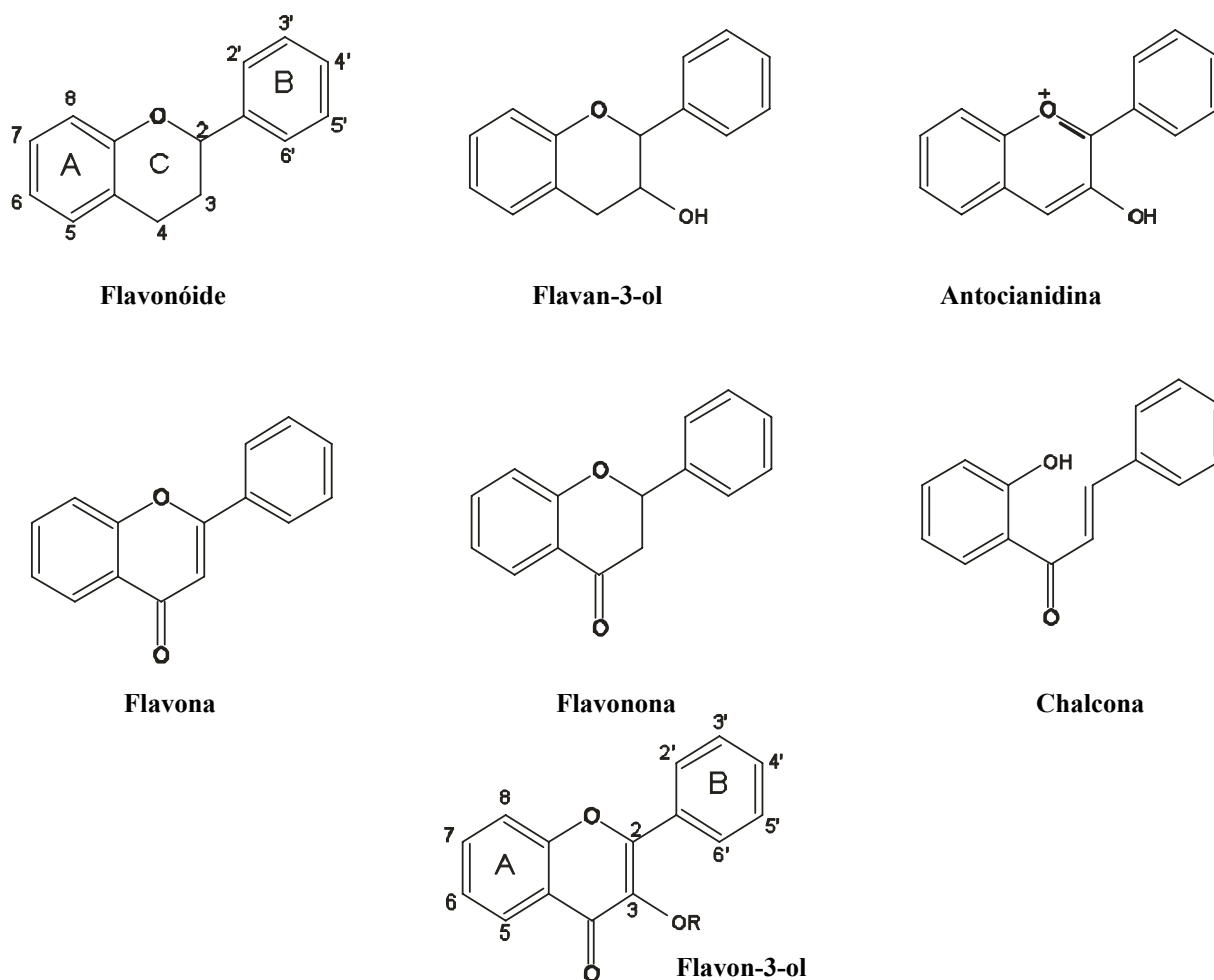
secundários aromáticos. Porém, alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos taninos e dos flavonóides (CARVALHO et al., 2000; SANTOS, 2000; ZUANAZZI, 2000).

Os compostos fenólicos, particularmente os polifenólicos possuem uma variedade de atividades biológicas incluindo antiviral, antibacteriana, imune-estimulante, antialérgica, antihipertensiva, antiarrítmica, anti-trombótica, hipocolesterolêmica, antioxidante, hepatoprotetora, antiinflamatória e anticarcinogênica (FORMICA & REGELSON, 1995; ROBAK & GRYGLEWSKI, 1996; FAHIM et al., 1999; RICE-EVANS et al., 2000; GAO et al., 2001).

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes, diversificados e amplamente distribuídos na natureza. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios ultravioleta e ações antifúngicas) e de atração aos polinizadores (RHODES, 1994). Até a década de oitenta já haviam sido identificados mais de 4000 flavonóides em vegetais (HARBORNE et al., 1975; HARBORNE, 1986). Inicialmente reconhecidos como os pigmentos amarelos das flores, são também encontrados nos frutos, sementes, cascas de caule e em algumas bebidas como o vinho tinto (KEFFORD & CHANDLER, 1970).

A estrutura básica dos flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono, resulta de rotas biossintéticas separadas: a primeira do ácido chiquímico que origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, responsável por um dos anéis aromáticos (anel B) e a ponte de três carbonos e a segunda do acetato, via ácido malônico que resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides. Os flavonóides são usualmente divididos de acordo com o padrão de substituições na sua estrutura básica (**Figura 3**) e podem ocorrer como agliconas, glicosídeos e derivados metilados (BRUNETON, 1999; SANTOS, 2000).

Os flavonóides são conhecidos por possuírem um amplo espectro de atividades, como antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e antitumoral (DE MEYER et al., 1991; MIDDLETON et al., 2000; SALA et al., 2003; SKERGET et al., 2005). Heijnen et al. (2002) avaliando o efeito de flavonóides sobre a peroxidação lipídica, mostraram que existe uma relação estrutura-atividade antioxidante, onde a presença da função catecol, do orto - 3',4'- dihidrohidroxila no anel B, da dupla ligação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>, da hidroxila no anel C, além da conformação espacial e da lipossolubilidade da molécula influenciaram na bioatividade desses compostos.



Flavonóis	5	7	3 (R)	3'	4'
Quercetina	OH	OH	H	OH	OH
Campferol	OH	OH	H	-	OH
Isocampferídio	OH	OH	CH <sub>3</sub>	-	OH

**Figura 3.** Estrutura química de algumas classes de flavonóides. A parte inferior da figura mostra a estrutura básica do Flavon-3-ol (flavonol) e respectivos derivados que surgem de acordo com o padrão de substituições na molécula (modificado de MIDLETON et al., 2000).

Além disso, estudos (MORTON et al., 2000, CAO et al., 1996) revelam que os flavonóides são capazes de interferir em várias sistemas enzimáticos, incluindo lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase, fosfolipase A<sub>2</sub>, proteínas quinases, além de fatores de transcrição gênica como o Fator Nuclear kappa B (NF-κB).

Durante décadas formulações contendo flavonóides como princípios ativos têm

sido utilizadas no tratamento de várias doenças no homem (HAVSTEEN, 1983). Flavonóides tais como quercetina, luteolina e catequinas possuem atividade antioxidante mais potente do que a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno (GAO et al., 2001). Portanto, esses compostos podem prevenir, por exemplo, a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica induzidos pelos raios ultravioleta, que são processos envolvidos em patologias como o câncer de pele. Entretanto, tem sido observado que alguns compostos fenólicos, incluindo flavonóides, são mutagênicos e esse efeito parece resultar de uma ação oxidante (MIDDLETON et al., 2000; SVOBODOVA et al., 2003)

O isocampferídio (5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-3-metoxiflavona), é um derivado flavônico do campferol (Figura 3), flavonol conhecido por seu largo espectro de atividades biológicas (Pathak et al., 1991; Middleton Jr et al., 2000). Além de *Amburana cearensis* o isocampferídio foi isolado também de outras espécies (*Psidia trinervia*, *Combretum quadrangulare*, *Centaurea bracteata*, *Genista ephedroides* e *Cirsium rivulare*) sob a forma livre ou glicosilada (WANG et al., 1989; PISTELLI et al., 1999; BANSKOTA et al., 2000A; NAZARUK & JAKONIUK, 2005).

Estudos farmacológicos demonstraram que o isocampferídio possui atividade hepatoprotetora *in vitro* e antimicrobiana sobre o poliovírus, rinovírus e *Bacillus cereus* (WANG et al., 1989; BANSKOTA et al., 2000b). Além disso, esse 3-metilflavonol, foi capaz de inibir o crescimento de algumas linhagens tumorais e o processo mitótico observado em ovos de ouriço-do-mar, *Lytechinus variegatus* (BANSKOTA et al., 2000a; COSTA-LOTUFO et al., 2003).

Os glicosídeos fenólicos possuem descritas várias atividades farmacológicas tais como antioxidante, antiinflamatória, vasorelaxante e antiproliferativa, e a semelhança do que foi observado para os flavonóides, em algumas circunstâncias existe também uma estreita relação estrutura-atividade farmacológica (WU et al., 2005; SVOBODOVA et al., 2003; RÖSCH et al., 2003; MORTON et al., 2000).

Existem poucos estudos quanto as possíveis propriedades farmacológicas dos amburosídeos A e B, glicosídeos fenólicos isolados de *A. cearensis*. Bravo et al., (1999) avaliaram as atividades antimalárica, antiprotozoária, antifúngica e antibacteriana desses glicosídeos, onde foi observado que apenas o amburosídeo A na dose de 50 mg/kg/dia apresentou atividade antimalárica, reduzindo em 25% a parasitemia (*P. berghei*). Estudo envolvendo a avaliação dos possíveis efeitos antiproliferativos de compostos isolados das cascas do caule de *A. cearensis*, mostrou que o amburosídeo A não foi citotóxico para os ovos de ouriço nem inibiu o desenvolvimento de células tumorais (COSTA-LOTUFO et al., 2003).

Em estudos anteriores (LEAL et al., 1995; 1997; 2000; 2003) estabelecemos as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e relaxante muscular do EHA, da cumarina e da fração flavonóide obtidos de *A. cearensis*, resultados importantes por justificarem em parte o uso tradicional da planta indicada principalmente no tratamento de afecções respiratórias, como tosse, bronquite e asma. Assim, para elucidarmos o papel de outros constituintes químicos da planta, tais como o isocampferídio e o amburosídio A, foram investigados seus efeitos sobre a inflamação, estresse oxidativo e o músculo liso das vias aéreas.

#### **1.4. O Processo inflamatório**

A inflamação é o mais primitivo mecanismo de defesa e de reparo do organismo animal em resposta a um patógeno invasor. Há registros de suas características clínicas em papiros egípcios (~ 3.000 a.C), mas foi Celso - escritor romano, no século I d.C. que relacionou os quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, dor e edema (WEISSMAN, 1992). O processo envolve uma reação complexa à agentes nocivos, como microorganismos e células danificadas, que envolve respostas vasculares, migração e ativação de leucócitos e reações sistêmicas. Muitos tecidos e células participam dessa reação, incluindo o fluido, proteínas plasmáticas, células circulantes, vasos sangüíneos e componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo. As células circulantes incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, e plaquetas. As células do tecido conjuntivo incluem os mastócitos, que estão intimamente ligados aos vasos sangüíneos; fibroblastos, macrófagos locais e linfócitos. Na matriz extracelular, estão envolvidas proteínas fibrosas estruturais (colágeno, elastina), glicoproteínas de adesão (fibronectina, laminina, colágeno não-fibrilar, tenascina e outras) e proteoglicanos (MURPHY, 2000; KUMAR et al., 2005).

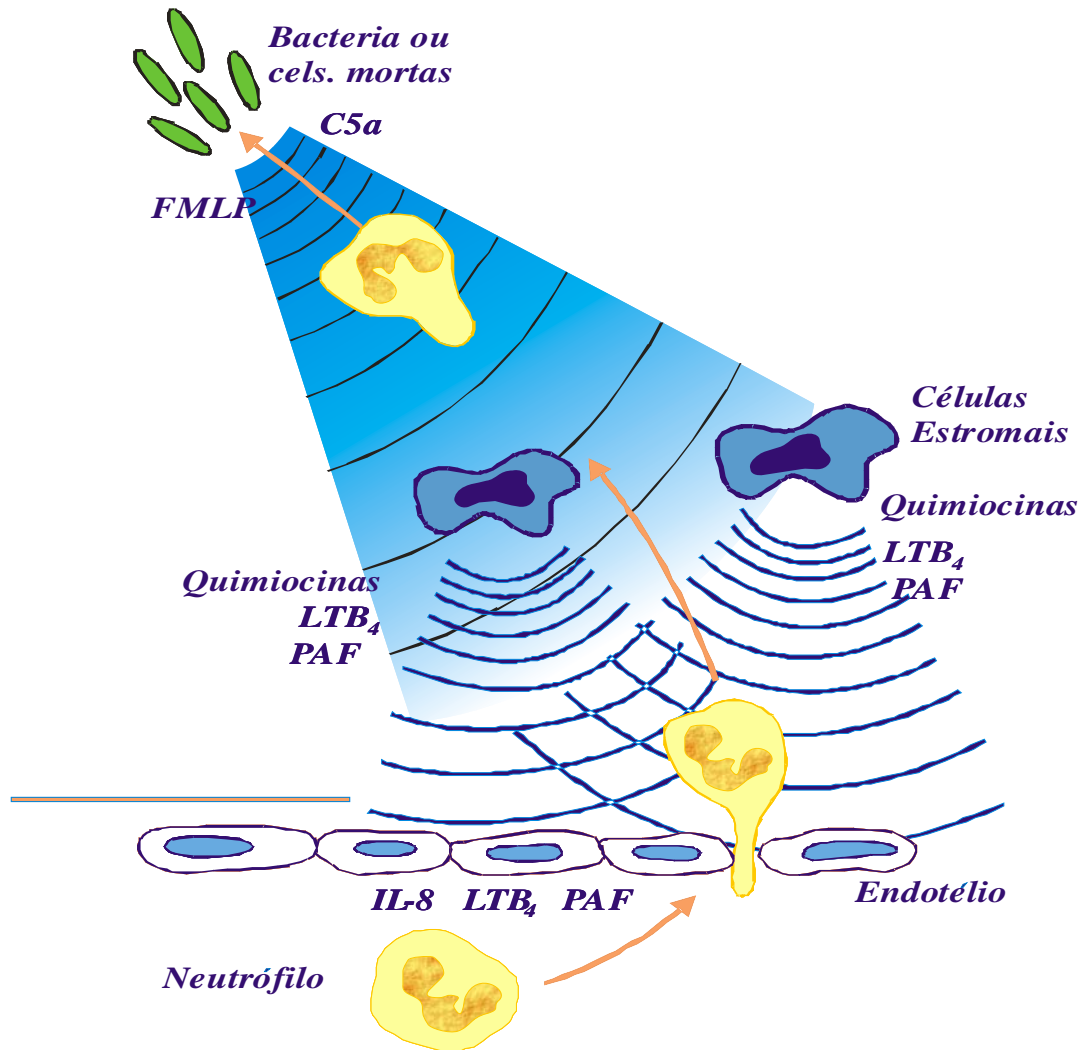
A inflamação aguda é uma resposta rápida a um agente nocivo, encarregada de levar mediadores da defesa do hospedeiro ao local da lesão. Na resposta vascular a vasodilatação é uma das primeiras manifestações da inflamação aguda, que é induzida pela ação de vários mediadores, como histamina e óxido nítrico. É responsável pelo calor e rubor. A vasodilatação é seguida pelo aumento na permeabilidade da microcirculação, que leva ao extravasamento de fluido rico em proteína (exsudato) para o tecido extravascular causando o edema (MAJNO & PALACE, 1961; SUFFREDINI et al., 1999). Uma função crítica da inflamação é o encaminhamento de leucócitos à lesão e sua ativação para que desempenhem suas funções normais de defesa do hospedeiro (MCDONALD et al., 1999).

- **Inflamação e Migração Celular**

Os leucócitos são células sanguíneas que compreendem os granulócitos, relacionados à resposta imune inespecífica, e os monócitos e linfócitos, relacionados à resposta imune específica. Os granulócitos, que constituem aproximadamente 63% dos leucócitos, são células polimorfonucleares (PMNs) que apresentam núcleo segmentado e grânulos específicos em seu citoplasma (SILBEMAGL & DESPOPOULOS, 2001).

A migração e a ativação de leucócitos são consideradas um dos principais mecanismos de defesa da imunidade inata. A migração pode ser dividida nas seguintes etapas: 1. Lúmen: marginação, rolamento e adesão ao endotélio; 2. Transmigração através do endotélio (diapedese) e 3. Migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático (MULLER, 2002). Na marginação há o acúmulo de leucócitos na periferia do fluxo, próximo à superfície vascular. Subseqüentemente, os leucócitos vão rolando pelo endotélio, aderindo transitoriamente a ele (processo chamado de rolamento) através das E e P-selectinas, moléculas de adesão apresentadas pelas células endoteliais que se ligam à moléculas de glicoproteínas (ex.: Ligante-1 da P-selectina - PSGL-1) na superfície dos leucócitos, que por sua vez também apresentam L-selectina na sua superfície. A firme adesão dos leucócitos ocorre após sua ativação por mediadores como PAF, IL-8, fator de complemento C5a, citocinas e produtos bacterianos, fMLP e lipopolissacarídeo - LPS. Os mediadores ligam-se aos neutrófilos por meio de receptores acoplados a proteína G. A adesão dos leucócitos à parede do vaso sanguíneo finalmente ocorre por meio de integrinas (CD11a(b,c)/CD18), que após a ativação dos leucócitos, é capaz de se ligar à molécula de adesão (molécula de adesão intercelular 1 - ICAM-1 e molécula de adesão da célula vascular - VCAM-1) da superfície endotelial. Ocorre então aumento da permeabilidade e os leucócitos migram para o interstício, processo facilitado pela ação de enzimas proteolíticas como elastase e colagenase (MANTOVANI & SOZZANI, 1997; GONZALEZ-AMARO et al., 1999; MC-EVER, 2002; HYNES, 2002).

A migração unidirecional de células inflamatórias, como neutrófilos e monócitos, através dos espaços endoteliais ocorre através de um gradiente de concentração de fatores quimiotáticos (**Figura 4**) (WITKO-SARSAT et al., 2000). Alguns desses fatores quimiotáticos têm sido identificados nos últimos 30 anos, incluindo produtos bacterianos, C5a, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), PAF, citocinas, especialmente a superfamília das quimiocinas (proteína de quimioatração do monócito -1 (MCP-1), eotaxina, proteína inflamatória do macrófago-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) e RANTES (regulada por meio de ativação expressa e secretada por células T



**Figura 4.** Migração quimiotática de neutrófilos através de um gradiente de quimiocinas até o sítio de inflamação ou infecção (WITKO-SARSAT et al., 2000)

normais). O tipo de leucócito que migra varia com a duração da resposta inflamatória e com o de tipo do estímulo. Em geral na inflamação aguda, os neutrófilos predominam no infiltrado inflamatório durante as primeiras 6 a 24 horas, sendo substituídos pelos monócitos depois 24 a 48 horas (MADGE & PROBER, 2001; ROSSI & ZLOTNIK, 2000; MURPHY, 1994; JONES, 2000).

Historicamente os PMNs, têm sido considerados como uma população de leucócito envolvida na resposta inflamatória aguda, atuando como a primeira linha de defesa contra a invasão de microorganismos, não sendo citados como uma fonte importante para a síntese de mediadores inflamatórios. Entretanto, vários estudos (CASSATELLA, 1999; MCCOLL et al., 1992) têm mostrado que essas células possuem um papel fundamental não

somente na resposta inflamatória aguda, mas também na inflamação crônica e/ou regulação imune.

- **Leucócitos Polimorfonucleares: neutrófilos**

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do sistema imune inato e são responsáveis pela fagocitose, morte e digestão de bactérias e fungos (SEGAL, 2005).

Descobertos por Elie Metchnikoff em 1880, é o componente celular mais abundante do sistema imune e compreendem 90 % dos granulócitos circulantes. Um adulto saudável possui entre 3.000 e 7.500 neutrófilos/ $\mu\text{L}$  (METCHNKOFF, 1968; COHEN, 2002).

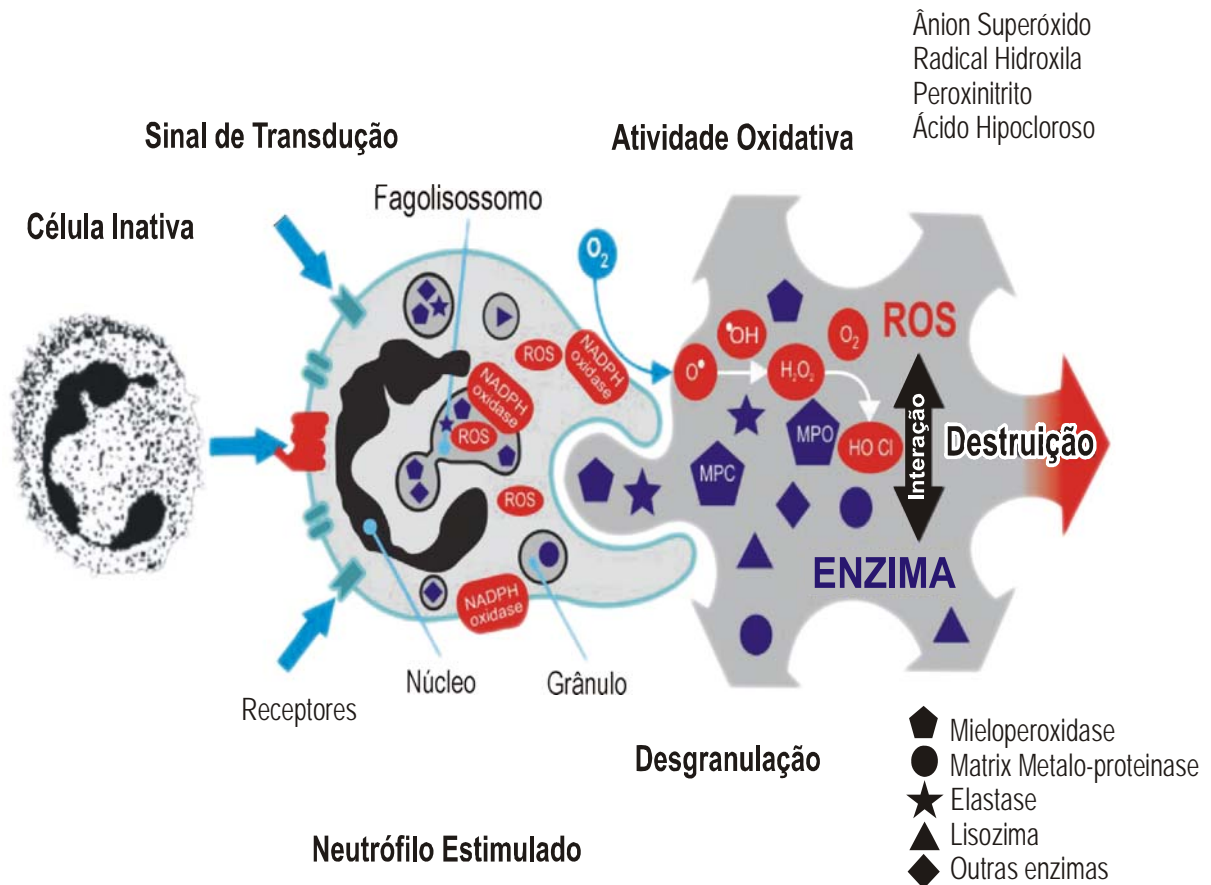
Ao migrarem para o foco inflamatório os neutrófilos são estimulados e reconhecem e fagocitam bactérias e outros microorganismos, que são expostos a um arsenal de enzimas hidrolíticas armazenadas nos grânulos da célula, além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) formadas mediante a estimulação dos neutrófilos (FANTONE & WARD, 1982; ALLEN & STEVENS, 1992; WITKO-SARSAT et al., 2000) (**Figura 5**).

A fagocitose estimula um surto de consumo de oxigênio, glicogenólise e a produção de ROS. A geração de ROS ocorre devido a ativação de uma oxidase (NADPH oxidase), que oxida o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídio - P reduzido) e, nesse processo, reduz o oxigênio, formando o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). O superóxido é, então, convertido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que é utilizado como substrato pela enzima mieloperoxidase contida nos grânulos dos neutrófilos, para a produção do HOCl, potente agente antimicrobiano (PITHON et al., 1998; SEGAL, 2005).

A produção de ROS é essencial para a destruição de microorganismos, como pode ser observado pela susceptibilidade à infecções dos indivíduos com doença granuloma tosa crônica, uma doença genética onde a NADPH oxidase encontra-se inativa (SMITH & CURNUTTE, 1991). Contudo, a destruição de bactérias pode ser feita também por substâncias presentes nos grânulos dos leucócitos (RISSO, 2000).

Os neutrófilos possuem três tipos de grânulos, os primários ou azurófilos; os secundários ou específicos e os terciários ou gelatinase, que diferem quanto as suas funções primárias (BORREGAARD & COWLAND, 1997). Os grânulos primários ou azurófilos contêm proteínas e peptídios direcionados para a destruição de microorganismos e digestão, enquanto os grânulos específicos complementam os componentes da membrana e auxilia para limitar as reações de radicais livres. Os grânulos azurófilos contêm mieloperoxidase (MPO) e três proteinases neutras: a catepsina G, a elastase e a proteinase 3 (WEISS et al., 1975; KOLSET, 1990). Os grânulos específicos contêm lactoferrina insaturada, uma proteína





**Figura 5.** Estimulação de neutrófilos. (modificado de <http://www.uni-leipzig.de/~biophys/arnhold.htm#Seitenanfang> – acesso: 23/01/2006)

que se liga e seqüestra o ferro e o cobre presente, transcobalamina II, que se liga a cianocobalamina (BAGGLIONI et al., 1969), gelatinase e outras proteínas que são encontradas também na membrana plasmática, incluindo flavocitocromo b<sub>558</sub> e NADPH oxidase (SEGAL & JONES, 1979). Os grânulos terciários ou gelatinase possuem esse termo para indicar a presença de gelatinase e não de lactoferrina (HIBBS & BAINTON, 1989). Os lisossomos contêm hidrolases ácidas e as vesículas secretórias constituem um reservatório importante de componentes da membrana. Estas enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular, onde mantêm sua atividade proteolítica ao redor do processo inflamatório (SENGELOV et al., 1994; BORREGAARD & COWLAND, 1997).

- **Inflamação e marcadores enzimáticos: mieloperoxidase e elastase**

Uma das principais enzimas liberadas pelos grânulos azurófilos dos neutrófilos é

a mieloperoxidase (MPO), uma heme proteína expressa em abundância por PMNs, constituindo aproximadamente 5% das proteínas totais dos neutrófilos e acima de 25% das proteínas no grânulo. Assim, os neutrófilos constituem a principal fonte de MPO, que pode ser encontrada também nos macrófagos e fluidos biológicos (saliva, líquido sinovial, sêmen e outros), bem como no coração, rins, pele, fígado e placenta (EDWARD et al., 1988; KLEBANOFF, 1999; PEDRO et al., 2003). Os monócitos contêm apenas 1/3 da MPO encontrada nos PMNs, enquanto os grânulos dos eosinófilos contêm uma enzima relacionada, a peroxidase eosinofílica, que possui homologia com a MPO em 69,8 % na seqüência de aminoácidos (CARLSON et al., 1985; SAKAMAKI et al., 1989).

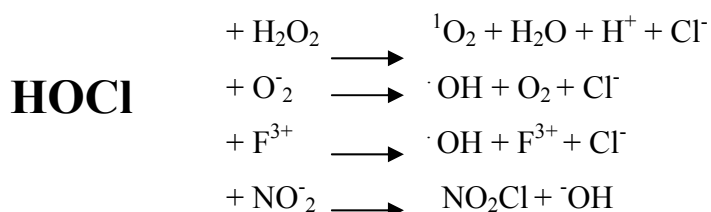
A MPO é uma proteína glicosilada fortemente catiônica e tem um peso molecular de 144 KD. É constituída por dois dímeros idênticos ligados por uma ponte dissulfeto, e possui um grupo protoporfirina com um íon ferro central. A estrutura tridimensional da MPO foi recentemente obtida com uma resolução de 1,8 Å (NAUSEEF & MALECH, 1986; FIEDLER et al., 2000).

A MPO nos estados ativados, principalmente composto I ( ${}^+PorFe^{4+}=O$ ), mas também composto II ( $PorFe^{4+}-OH$ ), é capaz de oxidar diferentes substratos. A enzima nativa ( $PorFe^{3+}$ ) pode ligar-se ao ânion superóxido ou ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). No primeiro caso, na ativação da enzima forma-se o composto III, que está aparentemente envolvido na hidroxilação de substratos aromáticos. O  $H_2O_2$  é reduzido à água pela MPO nativa, levando a formação do composto I, que pode ser reduzido a forma nativa pelo íon cloreto ou mediante duas reduções subseqüentes via formação do composto II (KETTLE & WINTERBOURN, 1994).

Muitos substratos são conhecidos serem oxidados pelo composto I, e em menor extensão pelo composto II, tais como tirosina, triptofano, derivados fenólicos e indólicos,  $H_2O_2$ , xenobióticos e outros (MÁRQUEZ & DUNFORD, 1995; BURNER et al., 1999; 2000). Nesse processo, vários radicais, ácidos e outros produtos gerados estão envolvidos em danos macromoleculares e na degradação tecidual (ARNHOLD, 2004).

O neutrófilo sintetiza  $H_2O_2$  por ação da enzima superóxido dismutase, daí a MPO na presença do íon cloreto, converte o  $H_2O_2$  em ácido hipocloroso (HOCl), agente oxidante bactericida poderoso que destrói os microorganismos pela halogenação ou pela oxidação de proteínas e lipídios (peroxidação lipídica). O sistema  $H_2O_2$  – MPO – hialida é o sistema bactericida mais eficiente e mais importante presente nos neutrófilos. Outros substratos para MPO incluem o tiociano e o nitrito (KLEBANOFF, 1999; KETTLE & WINTERBOURN, 1994; VAN DER VLIET et al., 1997; HAMPTON et al., 1998).

Algumas reações do HOCl levam à formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio com alto potencial de lesão tecidual, tais como o radical hidroxila, gerado da reação do HOCl com o ânion superóxido ou  $\text{Fe}^{2+}$  (CANDEIAS et al., 1993; WARDMAN & CANDEIAS, 1996) (**Figura 6**).



**Figura 6.** Formação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio a partir de reações com o HOCl, produto da enzima mieloperoxidase (ARNHOLD, 2004).

O aumento da atividade da MPO tem sido demonstrado em várias patologias como processos infecciosos, inflamatórios e isquêmicos. Nessas circunstâncias tem sido observado que o aumento significativo da atividade da MPO dá-se em proporção direta ao número de neutrófilos infiltrados no tecido, assim, a atividade dessa enzima tem sido utilizada como índice de migração leucocitária. A MPO também aumenta a produção de ROS nos PMNs (BRADLEY et al., 1982; DAUGHERTY et al., 1994; HAMPTON et al., 1998; PEDRO et al., 2003).

Estudos recentes têm mostrado que oxidantes resultantes da ação da MPO estão criticamente envolvidos na modulação de vias de transdução. Por exemplo, concentrações baixas de HOCl produzido por MPO, é capaz de ativar MAP (*mitogen-activated protein*) quinase (MIDWINTER et al., 2001), induzir a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B (Schoonbroodt et al., 1997) e de modular a atividade de metaloproteinases (Fu et al., 2004). Além disso, os radicais livres gerados pela ação da MPO interferem com a via de transdução vascular pela oxidação do ON endotelial (EISERICH et al., 2002; BALDUS et al., 2001).

Recentemente, Lau et al. (2005) demonstraram que a MPO ao ligar-se às integrinas CD11b/CD18 nos PMNs, induzem uma cascata de reações intracelulares que levam a um aumento na degranulação de PMNs, na expressão de CD11b e na atividade da NADPH oxidase de maneira autócrina. Assim, diante dessas propriedades a MPO caracteriza-se como um mediador pró-inflamatório, além das suas atividades bactericida e enzimática.

A elastase leucocitária, é a principal proteinase sérica secretada no homem, presente predominantemente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e nos monócitos. A

enzima elastase secretada pelos neutrófilos é um polipeptídeo com 218 aminoácidos, ligados por pontes dissulfeto e possui um sítio catalítico formado pelos aminoácidos histidina, aspartato e serina. Esta ordem dos aminoácidos é conservada em todas as serinoproteínases, como as enzimas pancreáticas elastase, tripsina e quimiotripsina (BODE et al., 1986; BELAAOUJ, 2002).

A elastase cujo pH ótimo de ação é neutro, é capaz de solubilizar a fibra elastina, proteoglicanos, vários colágenos, fibronectina e caderina, o que facilita a migração celular até o sítio inflamatório (WITKO-SARSAT et al., 2000). Ainda várias proteínas solúveis como fatores de coagulação sanguínea, imunoglobulinas, fatores do sistema complemento são substratos da elastase. Por fim, essa enzima também estimula *in vitro* linfócitos B a produzirem anticorpos (BAGGIOLINI ET AL., 1978; OWEN et al., 1997; NÉNAN et al., 2005).

Fisiologicamente a elastase está envolvida na degradação de bactérias gram-negativas e de materiais estranhos ingeridos durante a fagocitose. O efeito bactericida da elastase contra bactérias gram-negativas e não gram-positivas deve-se ao fato dessa enzima ser capaz de degradar a proteína externa de membrana (OmpA – *outer membrane protein A*), característica de bactérias gram-negativas (BELAAOUAJ, 2002).

Quando liberada durante a inflamação a elastase é rapidamente ligada aos inibidores enzimáticos,  $\alpha$ -1 e  $\alpha$ -2-antitripsina para formar o complexo elastase-inibidor, além de outros inibidores, como o inibidor de secreção de leucoprotease (SPLI), principal inibidor da elastase nas vias aéreas (STOCKLEY et al., 2000).

A elastase não é encontrada livre no meio extracelular, porém quando ocorre uma exocitose anormal ou há um desequilíbrio entre enzima e inibidor, dá-se o acúmulo de elastase no meio extracelular que é considerado a causa primária da lesão tecidual observada em várias patologias, como bronquite (LAI et al., 2004), Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC (NÉNAN et al., 2005), enfisema pulmonar (FUJITA et al., 1990; NISHI et al., 2003), Síndrome da Angústia Respiratória Aguda –SARA, choque séptico (DHAINAUT et al., 2001; DEVINE, 2003), fibrose cística (MCGARVEY et al., 2002) e artrite reumatóide (MOHR & WESSINGHAGE, 1983).

Em geral o enfisema pulmonar tem sido relacionado a um acúmulo de proteases liberadas por células, essas enzimas degradam o tecido conjuntivo dos pulmões e um relativo desequilíbrio envolvendo proteases e defesa antiproteolítica instala-se. Essa teoria é freqüentemente referida como “desequilíbrio protease-antiprotease” e envolve principalmente

proteases séricas como a elastase neutrofílica e a metaloelastase macrofágica (NÉNAN et al., 2005).

Compostos que inibam diretamente a elastase ou a sua liberação pelos neutrófilos são de interesse crescente para o desenvolvimento de novas drogas antiinflamatórias. Pesquisas com sementes de leguminosas têm resultado na descoberta de vários inibidores de proteinases séricas (RICHARDSON, 1991; BATISTA et al., 1996; TRONCOSO et al., 2003). Dentre as espécies estudadas podemos citar *Tamarindus indica*, que das sementes foi purificado um inibidor de elastase e tripsina (FOOK et al., 2005).

Estudos mostram que existe uma estreita relação entre o acúmulo de radicais livres (espécies reativas de oxigênio (ROS)/ espécies reativas de nitrogênio (RNS) e a evolução da inflamação (SALVEMINI et al., 2003). Mediadores inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento podem estimular a produção endógena por exemplo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um oxidante capaz de atuar como segundo mensageiro estimulando a cascata de proteínas quinases ligadas à expressão de genes inflamatórios ou ao controle do ciclo celular (SUNDARESAN et al., 1995; PARINANDI et al., 1999; CAI, 2005).

### **1.5. Inflamação e Estresse Oxidativo**

A produção de oxidantes é parte do metabolismo normal de vários tipos celulares e possui um papel importante para manter a homeostase celular. Os tecidos são constantemente submetidos à presença de ROS, tais como ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e outros gerados durante numerosas reações metabólicas (CASTILLO et al., 1992; CABRE et al., 2000). Para se proteger contra os efeitos nocivos dos oxidantes o organismo possui um sistema antioxidante. Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pró-oxidante e antioxidante em favor do primeiro, instala-se o chamado estresse oxidativo (PRIOR & CAO, 1999; COMHAIR & ERZURUM, 2002).

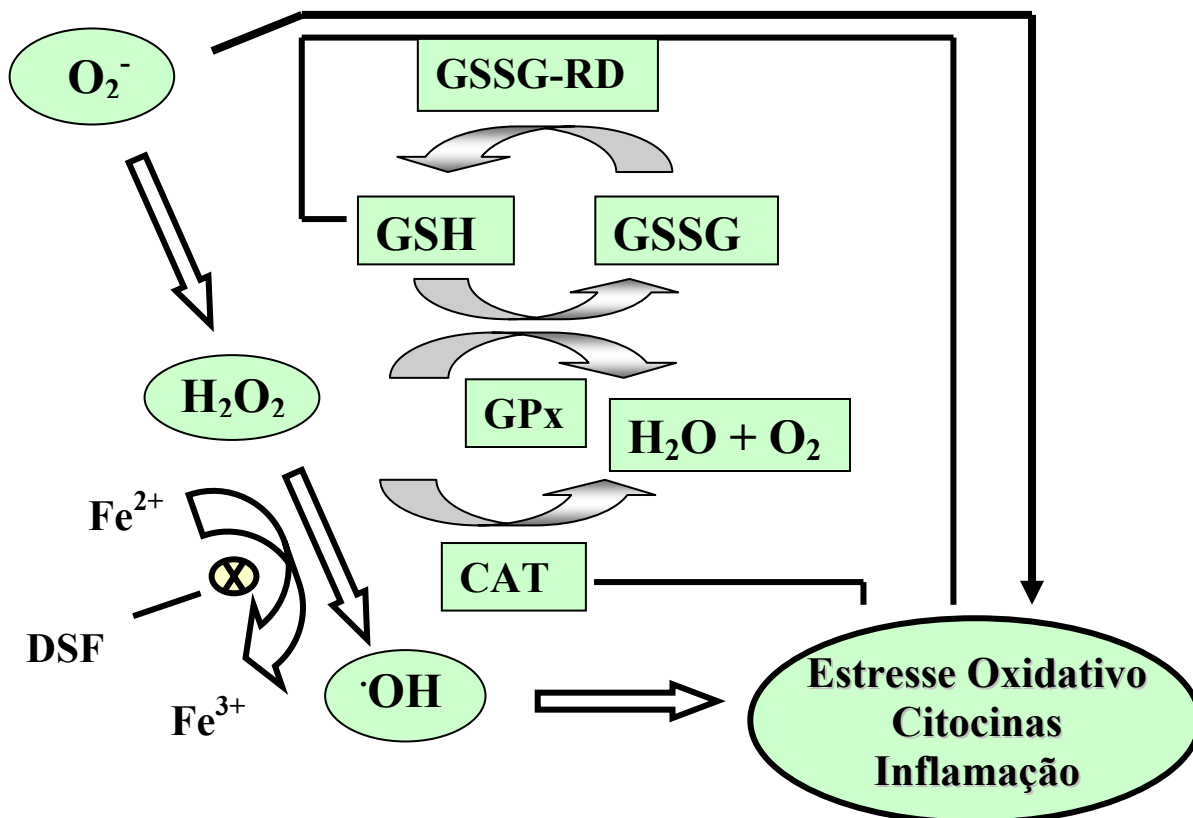
O estresse oxidativo produz transtornos no metabolismo celular, incluindo aumento na concentração intracelular de cálcio, alteração no transporte iônico, alteração na permeabilidade da membrana e destruição celular por peroxidação lipídica (RECKMAGE et al., 1989). As ROS têm sido implicadas como mediadores de várias patologias tais como, esclerose múltipla (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999), câncer hepático (MAJOR & COLLIER, 1998), artrite reumatóide (DARLINGTON & STONE, 2001), aterosclerose (SALVEMINI et al., 2002), além das doenças respiratórias incluindo a asma (HENRICKS & NIJKAMP, 2001; CARAMORI & PAPI, 2004).

Existem cada vez mais evidências que a típica inflamação crônica das vias aéreas observada na asma, resulta de um estresse oxidativo acentuado. Também muitos dos estímulos que exacerbam a asma, incluindo infecções virais e poluentes, podem ativar a produção de oxidantes, induzindo inflamação que produz os sintomas asmáticos (CARAMORI & PAPI, 2004). As ROS causam a asma por oxidação ou nitração de proteínas, lipídios ou DNA levando a perda da função dessas moléculas (FUJISAWA, 2005).

As células inflamatórias possuem uma capacidade excepcional para a produção de oxidantes. No foco inflamatório eosinófilos, neutrófilos, monócitos e macrófagos ativados, além das células epiteliais bronquial podem gerar oxidantes (BARNES et al., 1998; HENRICKS & NIJKAMP, 2001; BOWLER & CRAPO, 2002). As fontes enzimáticas potenciais de ROS incluem a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, sistema xantina oxidase citosólico, NADPH oxidase associado à membrana, enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido araquidônico (ciclooxigenase e lipoxigenase) e citocromo P450 (CARAMORI & PAPI, 2004; CAI, 2005).

O sistema de defesa antioxidante inclui antioxidantes não enzimáticos (ex.: glutatona, ácido úrico, bilirubina,  $\beta$ -caroteno (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)) e enzimáticos tais como, superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutatona-peroxidase (GSH-Px) (RECKMAGE et al., 1989; CASTILLO et al., 1992; MELIN et al., 2000). Nos sistemas eucariotos existem duas formas de SOD, a forma SOD-Cu-Zn encontrada no citosol, enquanto que SOD-Mn está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima têm papel antioxidante por catalisar a dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , na presença do próton  $H^+$  (MICHIELS et al., 1994; SIMIBE et al., 2001; ACHARYA et al., 1991). A catalase está localizada nos peroxissomos e no citosol da célula, e catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  (SHAN et al., 1990; MICHIELS et al., 1994). Esta enzima é encontrada no sangue, medula óssea, rim e fígado (MAYES, 1990). Sua atividade é dependente da NADPH (SCOTT et al., 1991). A GSH-Px remove o  $H_2O_2$  convertendo a glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A recuperação da GSH é feita pela enzima glutatona-redutase (GSSG-RD) (SING & PATHAK, 1990; COLES et al., 2003) (**Figura 7**).

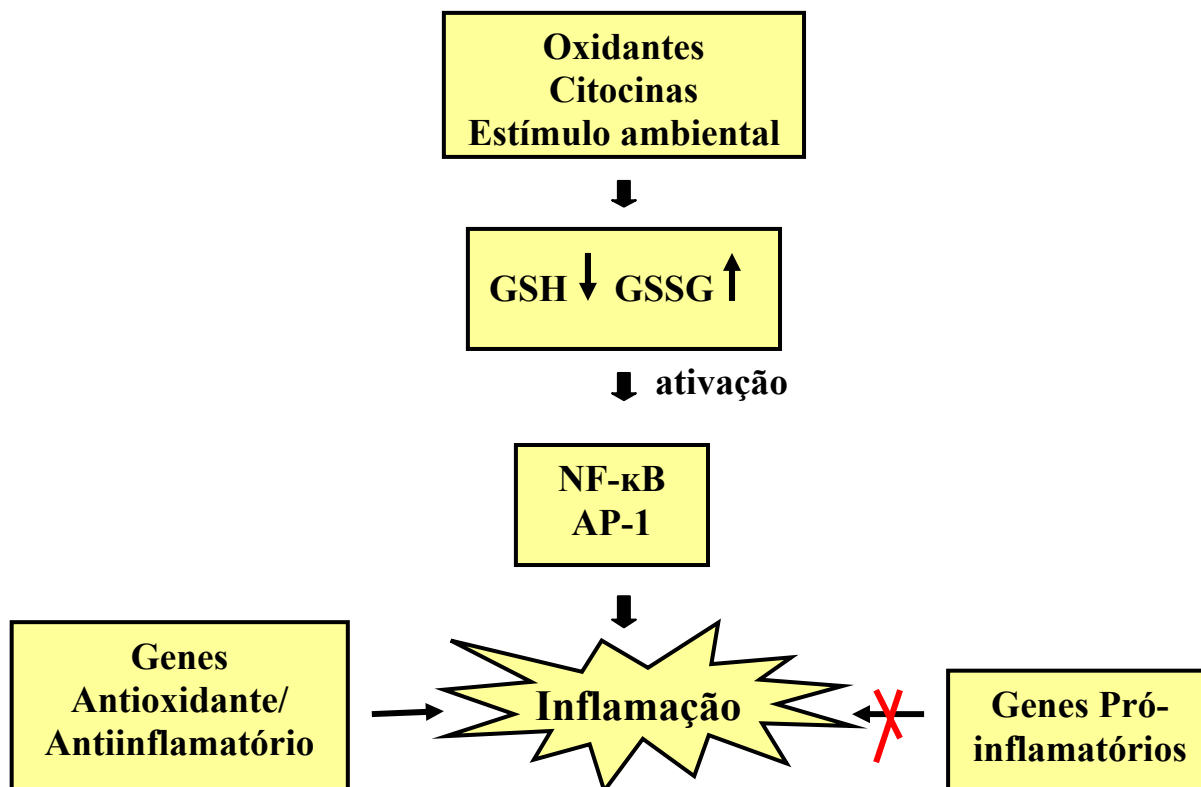
Os níveis de GSH/GSSG em resposta à estímulos oxidativos, modulam a expressão de genes pró-inflamatórios pela ativação de fatores de transcrição tais como Proteína Ativadora-1 (AP-1) e o NF- $\kappa$ B, e também de genes antioxidantes tais como SOD-Mn,  $\gamma$ -GCS-HS, GPx. Assim, nas células pulmonares, por exemplo, o equilíbrio na expressão dos genes pro e antiinflamatórios relacionados ao nível de GSH/GSSG é crítico para definir se o processo resultará em lesão celular ou proteção contra os efeitos danosos da inflamação



**Figura 7.** Representação esquemática da geração de ROS e suas dismutações. O ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é metabolizado via a reação de dismutação,  $O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ , que é catalisada pela superóxido dismutase (SOD). O  $H_2O_2$  é convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  pelas enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx), essa última mediante o consumo de glutaciona reduzida (GSH), levando a formação de glutaciona oxidada (GSSG), que é por sua vez reduzida pela glutaciona redutase (GSSG-RD). O  $H_2O_2$  pode ser ainda convertido no radical  $\cdot OH$  por uma outra via envolvendo o ferro. Essa reação catalizada pelo ferro, conhecida como reação de Fenton, é inibida pela desferrioxamina (DSF), um agente quelante que é capaz de neutralizar a toxicidade do  $\cdot OH$ . Fonte: HADDAD et al., 2005.

(Figura 8). Dessa forma, o conhecimento do mecanismo molecular que seqüencialmente regula a expressão desses genes nas células pode abrir um caminho novo na modulação da resposta inflamatória (RAHMAN & MACNEE, 2000).

Níveis elevados de alguns marcadores diretos ou indiretos do estresse oxidativo, incluindo malonildialdeído (MDA) e  $H_2O_2$ , têm sido encontrados na urina, plasma, lavado broncoalveolar e pulmões de pacientes com asma. Seus níveis estão freqüentemente relacionados a severidade da asma e são inversamente relacionados ao grau de equilíbrio dos



**Figura 8.** Ativação de fatores de transcrição NF-κB e AP-1 por oxidantes, estímulos ambientais e/ou citocinas alteram os níveis de GSH/GSSG que levam a indução de genes pró-inflamatórios e antiinflamatórios em células pulmonares. Produtos dos genes pró-inflamatórios causam inflamação das via aéreas, que é inibida (X) por genes antiinflamatórios/antioxidantes. Fonte: RAHMAN & MACNEE, 2000.

sistemas pró- e antioxidante (BARNES et al., 1998; HENRICKS & NIJIKAMP, 2001; BOWLER & CRAPO, 2002). Outros marcadores incluem proteínas (nitrotirosina e 3-bromotirosina), lipídios (isoprostanos e etano) e DNA (hidroxideoxiguanosina) (DWEIK et al., 2001; KHARITONOV & BARNES, 2001; 2002).

As ROS liberadas de eosinófilos, macrófagos alveolares e neutrófilos possuem um papel importante na asma brônquica. Elas podem induzir a contração do músculo liso das vias aéreas, a liberação de histamina pelos mastócitos, a secreção de muco e ainda interagem com inibidor de protease (PRYOR & DOOLEY, 1985; ALVING et al., 1993; HATCH, 1995).

Dessa forma, as ROS estão entre os inúmeros mediadores liberados em processos inflamatórios das vias aéreas e possuem um papel importante na patogênese de doenças como



a asma, a doença pulmonar obstrutiva crônica e a síndrome da angústia respiratória aguda (RAHMAN & MACNEE, 2000; HENRICKS & NIJKAMP, 2001).

### **1.6. Músculo Liso das Vias Aéreas**

O comportamento anormal do músculo liso, constituinte da maioria dos sistemas fisiológicos, como vasos sanguíneos, trato gastrointestinal e vias aéreas, está relacionado a uma série de patologias, incluindo hipertensão, aterosclerose e asma. Dessa forma, tem sido expressiva a dedicação de pesquisadores em elucidar as características biofísicas e bioquímicas do músculo liso das vias aéreas visando uma melhor compreensão de como se dá a sua alteração na asma (STEPHENS, 2002; WEBB, 2003).

Nas vias aéreas os nervos parassimpáticos constituem o principal sistema de controle motor, onde medeiam a broncoconstrição (BARNES, 1986; PENDRY et al., 1993). Porém, quanto ao controle exercido pelo sistema nervoso simpático existem algumas controvérsias, embora não existam dúvidas que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos estão presentes nas vias aéreas e que seus agonistas são broncodilatadores potentes (STEPHENS, 2002).

O músculo liso pode ser estimulado a contrair-se por múltiplos tipos de sinais: estimulação nervosa, estimulação hormonal, estiramento da fibra ou alterações no ambiente químico (KNOT et al., 1996; GUYTON, 2002). Nas vias aéreas os nervos parassimpáticos constituem o principal sistema de controle motor, onde medeiam a broncoconstrição (BARNES, 1986; PENDRY et al., 1993). Porém, quanto ao controle exercido pelo sistema nervoso simpático existem algumas controvérsias, embora não existam dúvidas que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos estão presentes nas vias aéreas e que seus agonistas são broncodilatadores potentes (STEPHENS, 2002).

A via neuronal não adrenérgica e não colinérgica citada pela primeira vez por Coburn & Tomita (1973), está também envolvida nos mecanismos broncoconstritor e broncodilatador das vias aéreas, com a participação de mediadores incluindo substância P, neurocinina A, peptídeo intestinal vasoativo e óxido nítrico. Além disso, embora as vias aéreas estejam sob forte controle colinérgico, outros mediadores também exercem seu controle, tais como leucotrienos, prostaglandinas, histamina e serotonina (SOLWAY & LEEF, 1991; BELVISE et al., 1993).

O papel importante dos neurônios sensoriais aferentes não mielinizados (fibras C) na regulação das funções das vias aéreas tem sido extensivamente observado em várias espécies, incluindo a humana. A ativação desses neurônios por vários tipos de irritantes, como

cigarro, ar frio e solução salina hipertônica, ou mediadores químicos endógenos pode resultar na broncoconstrição reflexa via mecanismo colinérgico mediado centralmente (COLRIDGE & COLERIDGE, 1984; ANDERSON & FISCHER, 1993). Além disso, a estimulação das fibras C por estímulos químicos, como a capsaicina, resulta na liberação de taquicininas, tais como a substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina que possuem efeitos biológicos potentes em vários tipos celulares incluindo a célula muscular lisa das vias aéreas (HOLZER, 1988; COLERIDGE & COLERIDGE, 1995; LEE & PISARRI, 2001).

O dano do epitélio das vias aéreas afeta a responsividade das vias aéreas de várias formas: (1) O epitélio atua como uma barreira fisiológica para difusão, assim ao ocorrer o dano epitelial, alérgenos, irritantes, gases e agonistas atingem com mais facilidade a célula muscular lisa. (2) A camada epitelial protege os neurônios da estimulação por produtos inalados, como os citados anteriormente. Portanto, a camada epitelial ao ser danificada expõe os neurônios sensoriais à ação de irritantes, por exemplo, e conseqüente broncoconstrição reflexa. (3) A camada epitelial tem uma função metabólica. Acetilcolina, histamina e neuropeptídeos podem ser sintetizados e/ou metabolizados pelas células epiteliais. Dessa forma, uma disfunção da camada epitelial pode resultar no aumento da concentração de vários agentes contráteis. (4) Finalmente, o epitélio das vias aéreas possui função secretora, ele sintetiza muco, citocinas e quimiocinas e libera fatores relaxantes, como a prostaglandina E<sub>2</sub> e o óxido nítrico (BOUSHEY et al., 1980; STERK & BEL, 1989; FOLKERTS & NIJKAMP, 1998).

O cálcio (Ca<sup>2+</sup>) é praticamente um mensageiro universal que controla uma diversidade de processos celulares, como a transcrição de genes, a proliferação celular e a contração muscular (BOOTMAN et al., 2001). O processo de contração da célula muscular lisa é iniciado pelo aumento na concentração intracelular dos íons Ca<sup>2+</sup>, que pode ocorrer através de vários mensageiros e canais (SOMLYO & SOMLYO, 1968). Dentre os mensageiros envolvidos, inclui inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>), óxido nítrico, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub><sup>-</sup>, diacilglicerol (DAG), ácido araquidônico e o próprio Ca<sup>2+</sup> (BOOTMAN et al., 2002).

Os canais de Ca<sup>2+</sup> são responsáveis pela entrada desse íon na célula em resposta à sinalização da membrana e podem ser classificados em: (I) canais de entrada de Ca<sup>2+</sup> e (II) canais de liberação Ca<sup>2+</sup>. A primeira classe subdivide-se ainda em: (1) canais de Ca<sup>2+</sup> voltagem-dependentes, que são ativados por despolarização da membrana através de estímulos químicos ou elétricos; (2) canais Ca<sup>2+</sup> operados por receptor que envolve a ativação de receptores e está associado a uma mínima ou inexistente despolarização da membrana; e (3) canais de Ca<sup>2+</sup> capacitativo, os quais são operados pela depleção de estoques intracelulares. A

segunda categoria inclui os canais dependentes de receptores para o  $IP_3$  e para a rianodina (BENOFF, 1998; COBURN, 1977; STEPHENS, 2002).

Os canais de  $K^+$  estão presentes no plasmalema de vários tipos celulares, contribuindo significativamente para a geração do potencial transmembrana e para a corrente de repolarização/hiperpolarização (ALEXANDER et al., 2000). A combinação de técnicas de eletrofisiologia, biologia molecular e a descoberta de ligantes seletivos, tais como a iberiotoxina tem levado a identificação e caracterização de vários tipos de canais de  $K^+$  (QUAST, 1993). Dentre esses pelo menos três tipos possuem uma função fisiológica e farmacológica importante na modulação da contratilidade do músculo liso das vias aéreas (**Tabela 1**) (PELAIA et al., 2002). Substâncias que aumentam a atividade dos canais de  $K_{Ca^{++}}$ , são esperadas reduzirem a excitabilidade celular e direta ou indiretamente diminuir a liberação de neurotransmissores e hormônios (GRIBKOFF et al., 1996).

Os nucleotídeos cíclicos têm um papel crucial na função celular de mamíferos. A concentração intracelular de nucleotídeos cíclicos é regulada por duas famílias de enzimas, adenilato e guanilato ciclases que sintetizam adenosina 3',5'- monofosfato cíclico (AMPC) e guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (GMPc) respectivamente, dos seus correspondentes nucleotídeos trifosfatos, e as fosfodiesterases (PDE) que catalisam a hidrólise e inativação do AMPC e/ou GMPc. A elevação de AMPC nas vias aéreas tem implicações importantes para a resposta celular nas reações alérgicas.

Agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos, amplamente utilizados como broncodilatadores no tratamento da asma, relaxam o músculo liso das vias aéreas através de mecanismo dependente de AMPC. Está bem documentado que o GMPc a semelhança do AMPC é um segundo mensageiro importante na regulação do tônus das vias aéreas (KATSUKI & MURAD, 1997; BARNES, 1995; BEAVO, 1995). Inibidores da PDE tipo 5, tais como o sildenafil e o zaprinast podem elevar o nível de GMPc, o que leva ao relaxamento do músculo liso traqueal de cobaia (BERNAREGGI et al., 1999).

Embora o presente estudo não tenha empregado modelos experimentais que mimetizem o processo asmático, o que constitui um objetivo futuro, foi considerado importante discorrer um pouco acerca do processo asmático. A razão para isso deve-se ao uso tradicional de *A. cearensis* no tratamento da asma, cujas características fisiopatológicas envolvem inflamação e broncoconstrição.

**Tabela 1.** Principais canais de potássio presentes nas vias aéreas.

Canais de K <sup>+</sup>	Abridores	Inibidores
Sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>		
- Larga condutância	Dihidrosoiasaponina-1 NS004 NS1619	Charibdotoxina Iberiotoxina
- Baixa condutância	--	Apamina
Retificadores	--	4-aminopiridina
Sensíveis ao ATP	Cromacalim Levcromacalim Pinacidil	Glibenclamida Tolbutamida

Fonte: PALAIA et al., 2002.

### 1.7. Papel da Inflamação e do Músculo Liso das Vias Aéreas na Asma

A asma é uma doença caracterizada por obstrução, inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas inferiores para uma variedade de estímulos, que resulta numa limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento. Clinicamente manifesta-se por episódios recorrentes de sibilância, dispnéia, aperto no peito e tosse, particularmente à noite e pela manhã ao despertar. Resulta de uma interação entre genética, exposição ambiental e outros fatores específicos que levam ao desenvolvimento e manutenção dos sintomas (BUSSE & LEMANSKE, 2001; COOKSON, 1999; KUMAR, 2001).

A hiperresponsividade ou hiperreatividade brônquica (HRB) caracteriza-se por uma resposta exagerada a uma variedade de estímulos que leva à broncoconstrição. Embora a HRB constitua uma característica essencial da asma, ela é encontrada também em outras condições incluindo infecção respiratória viral, displasia broncopulmonar, fumo, atopia, broncoectasia e fibrose cística (PATTEMORE et al., 1990; STERK, 1993). O mecanismo exato que contribui para HRB não está elucidado completamente, mas, envolve espessamento da parede muscular, aumentada contratilidade, controle neural autonômico alterado e processo inflamatório agudo e crônico das vias aéreas que pode causar dano epitelial (LAW et al., 2000). Na avaliação da HRB, além do teste de broncoprovocação com agentes broncoconstritores (metacolina, histamina, carbacol, neuropeptídeos e outros) tem sido empregado também testes não farmacológicos (ex.: estímulos físicos (hiperventilação) e

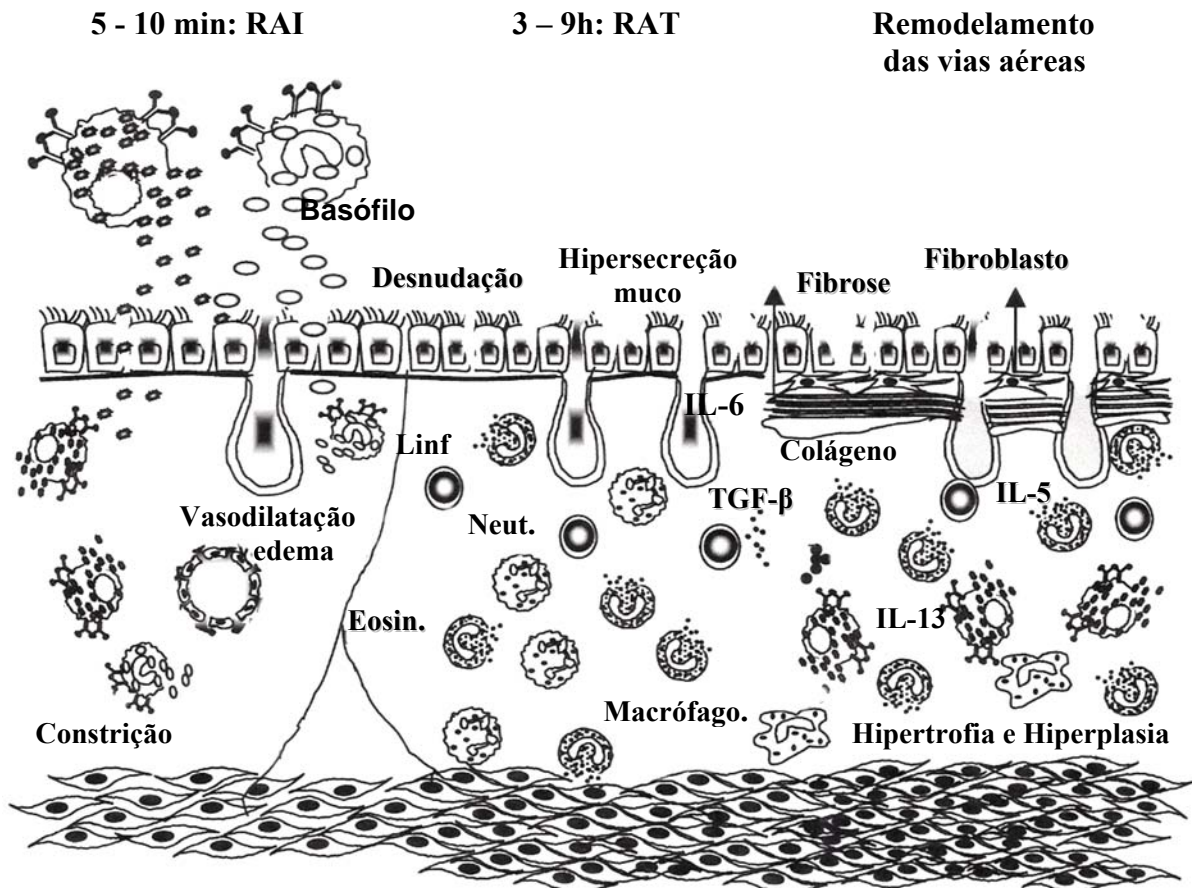
solução hipertônica), que tem sido empregado principalmente na Europa e na América do Norte (SBPT, 2002 - III Consenso da asma; LAW et al., 2000).

A inflamação brônquica constitui o mais importante fator fisiopatogênico da asma. É resultante de interações complexas entre os mediadores liberados por células inflamatórias, como linfócitos T, mastócitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos. Quando o asmático inala alérgenos, estes são apresentados pela células dendríticas aos linfócitos que proliferam (KUMAR, 2001; BARNES, 1998; DJUKANOVIC et al., 1990). A resposta asmática possui duas fases, a inicial e a tardia. A resposta inicial ocorre usualmente dentro de uma hora após a exposição ao antígeno, devido a ligação do complexo alérgeno - IgE específica à receptores de alta afinidade nos mastócitos e subsequente degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios. A resposta tardia inicia-se 3 – 4 h após a exposição ao antígeno, tendo seu pico em torno de 9h, enquanto a obstrução das vias aéreas dá-se entre 12 – 24h após exposição ao alérgeno (**Figura 9**) (PETERS et al., 1998; VARNER & LEMANSKE, 2000; BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004).

Assim, através desses inúmeros mediadores as células causam lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico, no tônus da via aérea, alterações na permeabilidade vascular, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (KUMAR, 2001; HOLGATE, 1997; 2000).

Certos pacientes asmáticos apresentam perda parcial e irreversível da função respiratória ao longo do tempo. Postula-se que o processo inflamatório crônico nas vias aéreas, pode através da liberação de diversos mediadores inflamatórios, causar alterações estruturais irreversíveis nas vias aéreas e conseqüente piora da broncoconstrição, contribuindo assim para o fenômeno da perda da função pulmonar. A este processo creditou-se o nome de remodelamento brônquico (MAUAD et al., 2000).

Enfim, na asma existem evidências (HOLGATE et al., 2003; BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004) que a maquinaria contrátil muscular encontra-se rodeada e bombardeada por mediadores inflamatórios, que parecem ser responsáveis, pelo aumento na velocidade de contração e pela diminuição na plasticidade muscular. Dessa forma, a disfunção do músculo liso das vias aéreas pode ser um dos primeiros mecanismos pelo qual a inflamação induz a hiperresponsividade, que somada ao remodelamento causa um comprometimento ainda maior na função muscular das vias aéreas no asmático (FERNANDES et al., 2003).



**Figura 9.** Resposta Alérgica Inicial (RAI), Tardia (RAT) e Remodelamento das Vias Aéreas na Asma. Cinco a dez minutos após a exposição ao antígeno, ocorre a RAI com a ligação dos alérgenos aos receptores de IgE nos mastócitos e basófilos, e a conseqüente liberação de mediadores que causam inflamação, vasodilatação e contração muscular. Citocinas e quimiocinas liberadas durante EAR recrutam células inflamatórias para o pulmão que leva a RAT 3 – 4 h após a exposição ao antígeno. A inflamação crônica nos pulmões leva a um remodelamento das vias aéreas envolvendo espessamento da mucosa, hiperplasia das glândulas submucosas, fibrose sub-epitelial, deposição de colágeno e aumento da massa muscular. TGG-β, fator de crescimento transformador - β; RANTES, regulada por meio de ativação expressa e secretada por células T normais.

Fonte: BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004.

### 1.8. Farmacoterapia da Asma

A asma como já descrito se divide em duas fases: aguda e crônica. Na crise aguda, são utilizados medicamentos com a finalidade de produzirem um relaxamento rápido dos brônquios, são os chamados broncodilatadores. Porém, a asma crônica é considerada uma doença inflamatória, e como tal é tratada com antiinflamatórios. Existem pelo menos três grupos de medicamentos classificados como antiinflamatórios utilizados na asma: 1) corticóides - grupo de melhor resultado, utilizado principalmente por via inalatória, apresentam biodisponibilidade baixa, ou seja, sem efeitos sistêmicos importantes ao contrário do que acontece quando administrados por via oral ou injetável; 2) cromonas - nedocromil e cromoglicato, empregados principalmente na asma leve; 3) antagonistas dos leucotrienos que podem ser ministrados em associação com os corticóides inalados, quando estes sozinhos não controlam a doença (SBPT, 2002 - III Consenso da asma; BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004).

Contudo, os tratamentos atuais têm causado efeitos colaterais e/ou não são muito efetivos em muitos pacientes com asma. Por exemplo, os agonistas adrenérgicos  $\beta_2$  não são muito efetivos no tratamento da reação alérgica tardia e o seu uso crônico tem causado taquicardia, tremores, câimbras e distúrbios metabólicos. Os efeitos colaterais dos corticóides são bem conhecidos, incluem intolerância à glicose, ganho de peso, aumento da pressão sanguínea, catarata, imunossupressão e redução na taxa de crescimento em crianças (LIN & CASALE, 2002). Assim, tem sido imperativo a busca de uma terapia que elimine ou reduza os inconvenientes da atual farmacoterapia.

Alguns exemplos dos avanços obtidos na terapia da asma incluem os anticorpos anti-IgE (BABU et al., 2001) e anti-IL-5 (mepolizumab) (KIPS et al., 2000), além da terapia com IL-12 (BRYAN et al., 2000). Vários genes pro-inflamatórios expressados no epitélio das vias aéreas são regulados por fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B (Fator Nuclear kappa B) e a AP-1 (Proteína Ativadora -1). Os glucocorticóides inibem o NF- $\kappa$ B diretamente por ligarem-se a ele ou indiretamente por aumentar a expressão do I $\kappa$ B, proteína que inibe NF- $\kappa$ B. Entretanto, devido aos efeitos colaterais dos glucocorticóides novos fármacos que inibam NF- $\kappa$ B estão sendo pesquisados (BARNES, 2002).

Estudos recentes mostraram que a suplementação com as vitaminas C e E reduziram o decréscimo da função pulmonar em asmáticos (ROMIEU et al., 2002; 2004). Antioxidantes novos como as nitronas e análogos da SOD estão sendo avaliados clinicamente (FLOYD et al., 2002; SALVEMINI et al., 2003).

Dessa forma, a pesquisa de fármacos que combinem as atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular e que apresentem menos efeitos indesejáveis em relação à farmacoterapia atual, é atrativo para o tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas.



## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

---



## 2.1. JUSTIFICATIVA

Árvore nativa da região Nordeste, *Amburana cearensis* (Fabaceae) silvestre, mais conhecida popularmente como cumaru possui um expressivo uso tradicional como antiinflamatório mas principalmente no tratamento da bronquite, tosse e asma. Estudos anteriores (LEAL et al., 1995; 1997; 2000, 2003) com Extrato Hidroalcoólico (EHA) das cascas do caule e constituintes químicos (cumarina e fração flavonóide) isolados do cumaru demonstraram suas atividades antiinflamatória, antinociceptiva e relaxante muscular em traquéia isolada de cobaia. Na avaliação clínica (Fase I, piloto) do xarope de cumaru que emprega como produto intermediário o EHA, não foram evidenciados sinais de toxicidade clínica (SAMPAIO et al., 2000).

A doença pulmonar obstrutiva ou das vias aéreas (ex.: enfisema, bronquite crônica e asma) é caracterizada por um aumento da resistência ao fluxo de ar devido a uma obstrução parcial ou completa, em qualquer nível, da traquéia e dos grandes brônquios até bronquíolos respiratórios terminais (KUMAR et al., 2005).

A brônquite crônica, tão comum entre tabagistas habituais e habitantes de cidades poluídas, não é uma entidade tão trivial como se pensava no passado. O fator primário ou desencadeador na gênese dessa doença parece ser uma irritação crônica por substâncias inaladas, como fumaça do tabaco, poeira de grãos, algodão e sílica. As infecções bacterianas e virais são importantes no desencadeamento das exacerbações agudas da doença. A característica mais inicial da bronquite é a hipersecreção de muco associada à hipertrofia das glândulas submucosas na traquéia e nos brônquios (DEMELLO & REID, 1995; KUMAR et al., 2005). As proteases liberadas por leucócitos, como elastase e catepsina, além de metaloproteinases estimulam a hipersecreção de muco (HAMPTON et al., 1998; LAI et al., 2004).

A asma é a mais comum das doenças inflamatórias crônicas das vias aéreas. Anualmente no Brasil ocorrem cerca de 350.000 internações por asma, constituindo-se na quarta causa de hospitalização pelo SUS (2,3% do total) e sendo a terceira causa entre crianças e adultos jovens (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). É uma doença caracterizada por obstrução, inflamação e hiperresponsividade das vias aérea inferiores para uma variedade de estímulos, que resulta numa limitação variável ao fluxo aéreo, reversível espontaneamente ou com tratamento (SBPT, 2002; III Consenso da asma). Na inflamação brônquica, as células inflamatórias através da liberação de inúmeros mediadores, tais como histamina, leucotrienos, ROS, MPO, elastase, proteína básica principal, peroxidase eosinofílica e citocinas que causam

alterações na permeabilidade vascular, lesões e alterações na integridade epitelial, anormalidades no controle neural autonômico (substância P, neurocinina A) e no tônus da via aérea, hipersecreção de muco, mudanças na função mucociliar e aumento da reatividade do músculo liso da via aérea (KUMAR, 2001; HOLGATE, 2000).

Atualmente, o xarope de cumaru é produzido pela Farmácia Escola-UFC, Programas Governamentais de Fitoterapia no estado, bem como por indústrias farmacêuticas nacionais. A padronização do xarope por CLAE-UV, vem sendo realizada pela determinação apenas do teor de cumarina (SILVA FILHO et al., 2000), embora possivelmente este não seja o único metabólito bioativo presente na planta.

Dessa forma, dando continuidade aos estudos anteriores decidimos investigar a possível bioatividade de outras substâncias presentes no cumaru. Para isso, foram avaliadas a toxicidade do amburosídio A (glucosídeo fenólico) e do isocampferídio (3-metilflavonol), bem como as atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular em traquéia de cobraia.

## 2.2. OBJETIVOS

### GERAL

Investigar os possíveis efeitos tóxicos do isocampferido (ICPF) ou do amburosídio A (AMB) isolados de *Amburana cearensis* e suas atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular em músculo liso de traquéia isolada de cobaia.

### ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos do ICPF e do AMB quando administrados em dose única em camundongos;
- Avaliar a citotoxicidade do ICPF e do AMB em cultura de células hepáticas;
- Investigar a atividade antiinflamatória do ICPF e do AMB, empregando modelos de inflamação aguda, tais como edema de pata, peritonite e permeabilidade vascular em ratos ou camundongos;
- Determinar o efeito do ICPF e do AMB sobre a desgranulação de neutrófilos isolados de sangue humano, através de determinações enzimáticas (mieloperoxidase e elastase);
- Pesquisar o possível efeito do AMB sobre a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em ratos; investigando a função hepática e o estresse oxidativo, além de análise histopatológica;
- Determinar os efeitos do ICPF e do AMB sobre o músculo liso traqueal de cobaia e esclarecer o(s) possível(is) mecanismo(s) de ação sobre a contratilidade muscular.

# MATERIAIS E MÉTODOS

---



### 3.1. MATERIAIS

Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa Animal – CEPA da Universidade Federal do Ceará, protocolo N<sup>o</sup> 21/04, segundo os princípios éticos adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- **Material botânico**

As cascas do caule de *Amburana cearensis* foram coletadas na fazenda São Vicente, na cidade de Quixeramobim - Ceará. Exsiccatas (n<sup>o</sup> 837 e 847) da espécie estão registradas no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC.

- **Isocampferídio e Amburosídio A isolados de *A. cearensis***

O isocampferídio, 3-metilflavonol, e o amburosídio A, glucosídeo fenólico, foram isolados do extrato etanólico das cascas do caule de *Amburana cearensis* e gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa em Química Orgânica, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, coordenado pelo Prof. Dr. Edilberto Silveira.

- **Animais**

Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar (120 a 180g) de ambos os sexos, camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-Webster (25 a 30g) de ambos os sexos ou cobaias albinas (*Cavia porcellus*) (300 a 450g) de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina desta mesma Universidade. Os animais foram divididos em grupos e mantidos aproximadamente durante uma semana no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimatação. Aos animais foram fornecidas água e ração *ad libitum*.

- **Sangue humano**

As amostras de sangue foram colhidas de doadores saudáveis, alunos, funcionários e professores da universidade. Vale registrar que a colheita foi realizada nas instalações do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará – Hemoce.

- **Drogas**

Carragenina, serotonina, bradicinina, histamina, prostaglandina E<sub>2</sub>, dextrano (PM 17,2), N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), citocalasina B, mieloperoxidase, glutatona reduzida, brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), carbacol, propranolol, 4-aminopiridina, iberiotoxina, glibenclamida, ester metil N<sup>G</sup> nitro-L-arginina (L-NAME), 1H-[1,2,4]oxadiazolol [4,3-a] quinoxalin-1-one (ODQ), indomethacina, fentolamina, etilenodiaminotetracético (EDTA) e Tween 80 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Os meios de cultura (Ham F-12 e Meio Eagle Dulbecco's modificado (D-MEM)) e o soro bovino fetal foram adquiridos da Gibco BRL. Dextrano 500 e percoll foram adquiridos da Amersham Biosciences do Brasil Ltda. N-t-butoxicarbonil-L-alanina-p-nitrofeniléster (Boc-Ala-OphNO<sub>2</sub>) foi adquirido da Fluka, Switzerland. Ácido tricloroacético, ácido tiobarbitúrico, p-nitrofenol, 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) foram adquiridos da Merck.

- **Composição das Soluções**

**Tabela 2 – Solução salina tamponada com fosfato (PBS)**

Composição	Quantidade	Empresa
Cloreto de sódio	8,0 g	Reagen
Cloreto de potássio	0,2 g	Reagen
Fosfato de sódio monobásico	0,2 g	Reagen
Fosfato de sódio dibásico	1,15g	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,4

**Tabela 3 – Solução de Turk**

Composição	Quantidade	Empresa
Ácido acético glacial	20,0 ml	Reagen
Violeta genciana	2,0 ml	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

**Tabela 4 – Solução de Albumina 3%**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Empresa</b>
Albumina bovina	3,0 g	Sigma-Aldrich
Água destilada q.s.p.	0,1 L	UFC

**Tabela 5 – Tampão HBSS (Solução Salina de Hanks)**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (mM)</b>	<b>Empresa</b>
CaCl <sub>2</sub>	1,2	Reagen
MgSO <sub>4</sub>	0,4	Reagen
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,42	Reagen
KCl	5,4	Reagen
Glicose	5,5	Reagen
NaCl	136	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,4

**Tabela 6 – Tampão HBSS modificado**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (mM)</b>	<b>Empresa</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,42	Reagen
KCl	5,4	Reagen
Glicose	5,5	Reagen
NaCl	136	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,4



**Tabela 7 – Tampão HBSS modificado concentrado**

<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Empresa</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,2 mM	Reagen
KCl	54,0 mM	Reagen
Glicose	55,0 mM	Reagen
NaCl	1,36 M	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

pH=7,0

**Tabela 8 – Solução de Krebs-Henseleit concentrada**

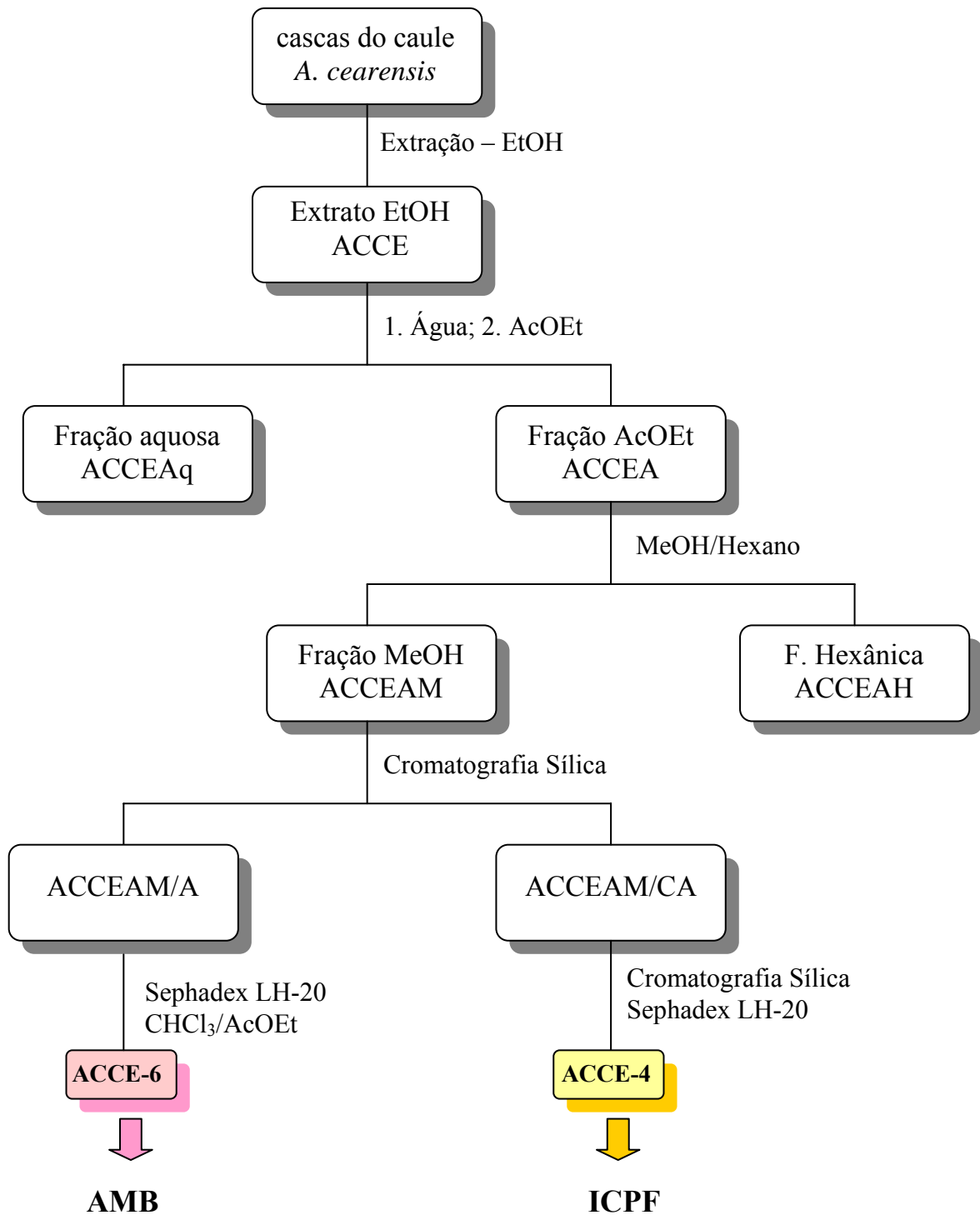
<b>Composição</b>	<b>Quantidade (mM)</b>	<b>Empresa</b>
NaCl	119,0	Reagen
NaHCO <sub>3</sub>	25,0	Reagen
KCl	4,7	Reagen
CaCl <sub>2</sub>	2,5	Reagen
MgSO <sub>4</sub>	1,1	Reagen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	Reagen
glicose	11,0	Reagen
Água destilada q.s.p.	1,0 L	UFC

No momento do uso a solução foi diluída 10 vezes, pH=7,4.

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. Estudo Químico - isolamento do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) das cascas do caule de *Amburana cearensis*

Como representado na **Figura 10**, as cascas do caule de *Amburana cearensis* (3,3 kg) foram trituradas mecanicamente e extraídas exaustivamente com etanol em aparelho de Soxhlet. O extrato etanólico foi concentrado por destilação do solvente, fornecendo 250 g de um sólido escuro de odor característico, conferido pela cumarina, denominado de ACCE. O ACCE (250 g) foi dissolvido em água, extraído com acetato de etila, obtendo-se uma fração aquosa (ACCEAq – 168,4 g) e outra fração acetato de etila (ACCEA – 74,0 g). A fração ACCEA, foi dissolvida em metanol e submetida à partição com hexano, obtendo-se assim uma fase hexânica e outra fase metanólica, que foi evaporada e acrescida de acetato de etila, além de água até a formação de duas fases. As fases hidrometanólica e acetato de etila foram concentradas e denominadas ACCEAM (13,8 g) e ACCEAH (47, 2 g) respectivamente. A fração ACCEAM (55,5 g) foi adsorvida em gel de sílica e acondicionada em coluna cromatográfica. Utilizou-se como eluentes: hexano/clorofórmio (1:1), clorofórmio, clorofórmio/acetato de etila (1:1), acetato de etila e metanol. As frações foram coletadas e denominadas: ACCEAM/HCl, ACCEAM/HC2, ACCEAM/C, ACCEAM/CA, ACCEAM/A, ACCEAM/M. A fração ACCEAM/CA foi cromatografada em gel de sílica, o que levou a um pool de frações, denominada ACCEAM/CA. Essa, após ser cromatografada por duas vezes em Sephadex LH-20<sup>®</sup>, resultou na obtenção de um sólido amorfo amarelo (114, 1 mg), denominado ACCE-4 e identificado como sendo o ICPF, por meio de análise dos dados espectrométricos de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. A fração ACCEAM/A (8-10) após cromatografia em Sephadex LH-20<sup>®</sup> foi obtido um sólido denominado ACCE-6 (1,02g) que teve sua estrutura elucidada através de espectroscópicos, RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, sendo caracterizado como AMB. As características físico-químicas do isocampferídio e do amburosídio a foram corroboradas por estudos anteriores (GANZERA, 1998; BRAVO et al., 1999; CANUTO, 2002). O estudo químico foi realizado no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação do Prof. Dr. Edilberto Silveira.



**Figura 10.** Esquema de fracionamento do extrato etanólico de *Amburana cearensis* para o isolamento do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB).

**Tabela 9.** Objetivos e métodos empregados nos estudos toxicológico e Farmacológico do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) isolados das cascas do caule de *Amburana cearensis*.

OBJETIVOS	MÉTODOS
Avaliar a toxicidade do ICPF e do AMB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Teste hipocrático em camundongos e citotoxicidade em células hepáticas de ratos</li> </ul>
Investigar a atividade antiinflamatória do ICPF e do AMB	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edema de pata, incluindo análise morfométrica em camundongos ou ratos;</li> <li>• Permeabilidade vascular em camundongos;</li> <li>• Migração celular: peritonite induzida por carragenina ou fMLP em camundongos;</li> <li>• Degranulação de PMNs-determinações enzimáticas (MPO e elastase)</li> </ul>
Avaliar a atividade hepatoprotetora e antioxidante do AMB em ratos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatotoxicidade inducida por CCL<sub>4</sub> em ratos : avaliação da função hepática; peroxidação lipídica (TBARS), dosagem de catalase e GSH.</li> </ul>
Investigar o efeito do ICPF e do AMB sobre a contratilidade em traquéia isolada de cobaia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efeito sobre o tônus basal e induzido por carbacol ou KCl;</li> <li>• Efeito sobre a traquéia sem epitélio;</li> <li>• Avaliar a participação do: óxido nítrico, guanilato ciclase e canais de potássio.</li> </ul>

O isocampferídio e amburosídio A foram dissolvidos numa solução aquosa de Tween 80, onde a concentração não excedeu a 4%.

**3.2.2. Avaliação dos efeitos gerais - teste hipocrático.** Camundongos Swiss de ambos os sexos foram divididos em grupos de 10 animais. Cada grupo foi submetido ao tratamento com ICPF ou AMB com dose única de 50, 100 e 200 mg/kg, administrada por via intraperitoneal (i.p.) num volume de 10ml/kg. Os demais grupos foram tratados com o veículo de dissolução do ICPF e AMB (Tween 80 a 4%) (controle) ou solução salina. Os animais foram observados 15, 30, 60, 120 minutos após o tratamento e a cada 24 horas durante 3 dias. Dentre os sinais investigados estão incluídos: alteração da motilidade, frequência respiratória, alteração na cor da urina, diarreia, analgesia, contorção abdominal, movimentos estereotipados, catatonía, piloereção, tremor, convulsão, sedação e morte.

### 3.2.3. Teste de citotoxicidade

Vários ensaios *in vitro* podem ser empregados na avaliação da potencial citotoxicidade de substâncias químicas. Esses ensaios necessitam de pequenas quantidades de substância teste e vários parâmetros podem ser determinados desde a contagem direta de células às medidas da integridade da membrana (ex.: lactato desidrogenase - LDH) e da atividade metabólica celular. A medida da função metabólica celular pode ser determinando o nível de ATP ou a atividade mitocondrial, esta investigada através do teste do MTT (brometo 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). Vários tipos celulares têm sido empregados nos ensaios de citotoxicidade incluindo, fígado, rim, pulmão, cérebro, testículo e ovário (BARILE et al., 1994).

- **Cultura de hepatócitos de ratos**

A cultura primária de hepatócitos constitui um dos sistemas *in vitro* de escolha para avaliar a citotoxicidade de xenobióticos. Isso, por manter um nível considerável de metabolismo e ser o fígado um órgão alvo primário quando na exposição à xenobióticos (HARBELL et al., 1997).

- **Isolamento de Hepatócitos**

Foram utilizadas ratas Wistar grávidas (200 – 240 g), que após anestesiadas com éter e sacrificadas por deslocamento cervical foram submetidas a laparotomia para a retirada dos embriões. O fígado depois de dissecado foi lavado com solução salina gelada,

fragmentado e mantido por 5 minutos em solução de EDTA 2 mM à 37°C no banho-maria sob agitação. A seguir o sobrenadante foi descartado e os fragmentos de fígado foram ressuspensos com solução de HANKS (3ml) contendo colagenase e DNase a 37°C no banho-maria. O sobrenadante foi coletado por três vezes a cada 8 minutos. Ao final desses, aos sobrenadantes (~ 9 ml) foi acrescentado 9 ml de D-MEM com Soro Bovino Fetal (SBF) a 10%, perfazendo um volume total de 18 ml. A solução foi então filtrada e centrifugada a 30g durante 2 min. O processo foi repetido por 3 vezes descartando o sobrenadante e acrescentando ao “pellet” o meio Ham F-12 (5ml). Após a última centrifugação, o meio foi ressuspensionado com D-MEM.

- **Condições de cultivo.**

Após a contagem dos hepatócitos foi realizado o plaqueamento com meio de Ham F-12/D-MEM (1:1) SBF 10%, empregando placas multi-*well* de 96 poços e de 6 poços previamente tratadas com poly-lisina numa concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. Ao meio de Ham F12 foi acrescentado dexametasona  $10^{-7}$  mol/l e insulina 0,6mg/l. A cultura foi mantida a 37°C em estufa a 5% CO<sub>2</sub>. Quatro dias depois do plaqueamento, a cultura foi utilizada para experimentação (LILJA et al., 1998).

- **Teste do MTT**

É um método colorimétrico utilizado para determinar a viabilidade celular e se baseia no fato do MTT, sal de coloração amarela, ser reduzido pelo sistema enzimático succinato-tetrazol redutase que forma parte da cadeia respiratória da mitocôndria, a um sal, Formazan, que possui cor púrpura. Assim, a ausência da redução do MTT indica uma diminuição na atividade metabólica celular, ou seja, na viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Decorridos 4 dias de cultura, o ICPF ou AMB foram adicionados à cultura em concentrações crescentes (0,1; 0,5; 1; 10; 50 e 100 µg/ml). Após 24 h de incubação o meio foi descartado e incubado um novo meio (200 µL) contendo 10% de MTT, na concentração de 5 mg/ml, e estas células foram incubadas por mais 3h. Por fim, foi descartado o sobrenadante e adicionado então 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan, nesse instante as placas foram agitadas durante 15 min com auxílio de um agitador de placas. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 540 nm. Os experimentos foram realizados em sextuplicata e repetidos em três dias diferentes.

### 3.2.4. Avaliação da atividade antiinflamatória em modelos *in vivo* e *in vitro*

- **Edema de pata induzido por carragenina em ratos**

Descrito por Winter et al. (1962) o edema inflamatório induzido pela injeção subcutânea de carragenina na pata é resultante da ação seqüencial e integrada de vários mediadores inflamatórios que causam um aumento agudo e progressivo do volume da pata. Assim, esse modelo tem sido considerado útil para avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos.

Ratos Wistar, machos (120-180 g) divididos em grupos de 8 animais foram tratados por via i.p. num volume de 10ml/kg, com ICPF (25 e 50 mg/Kg), AMB (25 e 50 mg/kg), indometacina (5 mg/Kg, i.p.) ou veículo (Tween 80 à 4% em água - controle) 30 min antes da injeção subcutânea de 100µL da solução de carragenina a 1% na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e 1, 2, 3, 4 e 24 h após a injeção de carragenina, através de pletismógrafo (Ugo Basile, Itália). O volume do edema foi determinado em ml pela diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção de carragenina.

- **Avaliação morfométrica.**

O estudo morfométrico foi realizado segundo o método de Aherne (1970), com fins de identificação e contagem de neutrófilos. Para tanto, foram escolhidos campos aleatórios de 40x, utilizando um retículo de linhas e pontas que permitiu a delimitação dos campos microscópicos. Quanto ao nível de profundidade, o estudo foi desenvolvido a nível profundo, este incluindo hipoderme e freqüentemente plano muscular.

- **Edema de pata induzido por dextrano, prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina, serotonina ou bradicinina em camundongos**

Os ensaios foram realizados segundo estudos anteriores (GAMSÉ et al., 1980; CUNHA et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2001). Camundongos Swiss (25-30 g) receberam uma injeção subcutânea (50 µL) na pata direita traseira da solução de dextrano 12%, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 30 nmol/animal), histamina (200 µg/animal), serotonina (200 µg/animal) ou bradicinina (3 nmol/animal). O volume da pata foi medido através de pletismógrafo (Ugo Basile) em diferentes intervalos de tempo após a injeção do estímulo inflamatório. Nos ensaios com bradicinina os animais foram pré-tratados com captopril (5 mg/kg, i.p.), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), para prevenir a ação das

cininases. Trinta minutos antes da injeção do estímulo inflamatório os animais foram tratados com ICPF (12,5; 25 e 50 mg/kg, i.p.), AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo (controle). O volume do edema ( $\mu\text{L}$ ) foi determinado conforme descrito no item anterior.

- **Aumento da permeabilidade vascular induzida por dextrano em pata de camundongos**

O edema de pata foi induzido segundo metodologia descrita no item anterior (1.3). Duas horas após a injeção de dextrano os animais foram sacrificados e realizadas as excisões das patas para determinação do extravasamento vascular (GAMSÉ et al., 1980). Porém, trinta minutos antes foi administrado por via intravascular uma solução de azul de Evans (25 mg/kg). As patas dos animais foram mantidas em formamida a 37°C durante 24 h e, após centrifugação do material a 2.500 r.p.m. durante 20 min a absorbância do sobrenadante foi determinada em 619 nm. A leitura da absorbância interpolada na curva padrão de azul de Evans permitiu a quantificação do corante extravasado e foi utilizado como índice do extravasamento protéico.

- **Peritonite induzida por carragenina ou N-Formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) em camundongos**

O ensaio foi desenvolvido segundo protocolo experimental proposto por Ferrándis & Alcaraz (1991). Grupos de 8 animais foram tratados com ICPF (25 e 50 mg/kg, i.p. e v.o.), AMB (25 e 50 mg/kg, i.p. e v.o.), dexametasona (5 mg/kg, v.o.) ou veículo. Decorridos 30 ou 60 minutos, os animais receberam uma injeção i.p. de 10 ml/kg de carragenina 1% ou fMLP ( $10^{-4}$  M). A seguir os animais foram devolvidos às caixas e deixados com livre acesso à ração e água durante 5 horas. O exsudato peritoneal foi coletado com uma pipeta Pasteur plástica através de laparoscopia abdominal. Para coleta todos os animais receberam uma injeção de PBS (Phosphate Buffer Solution) heparinizado (5 UI/ml). Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Türk para contagem de leucócitos totais. Enquanto, para contagem diferencial o exsudato foi centrifugado a 1.000 r.p.m. durante 5 min e ao sedimento foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de albumina bovina 3% para preparação das lâminas. As células foram coradas com o corante panótico rápido e os resultados foram expressos em número de células/ml.



- **Efeito do ICPF e do AMB sobre a degranulação leucocitária, mensurado pela atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase**

**Obtenção de leucócitos polimorfonucleares (PMNs).** O isolamento dos PMNs foi realizado conforme descrito por Boyum (1968). Para tanto, foi utilizado sangue humano de doadores sadios coletado com citrato de sódio 3,8% como anticoagulante. Ao sangue humano (400 ml) foi adicionado igual volume de solução de dextrano 2% em soro fisiológico. Após suave homogeneização a mistura foi deixada em repouso por 60 min, tempo necessário para a separação das duas fases. A fase superior, foi centrifugada a 325 g durante 15 min a temperatura ambiente e ao sedimento ligeiramente contaminado com hemácias foi adicionado 45 ml de água destilada a 4°C seguida de 5 ml de tampão HBSS modificado concentrado. Após centrifugação (325 g - 10 min a temperatura ambiente), foi adicionado ao sedimento 10 ml de HBSS modificado e em seguida 10 ml de Percoll (1,09 g/ml), para obtenção de um gradiente a separação das células PMNs. Por fim, o material foi novamente centrifugado, 20.000 g durante 20 min., e a fase intermediária, foi separada, ressuspensa em HBSS e realizada a contagem de leucócitos, predominantemente neutrófilos ( $85,0 \pm 2,8$  %). A viabilidade celular foi determinada pela técnica de Azul Tripán a 2% (células viáveis:  $89,0 \pm 2,0$  %) e pelo teste do MTT (item 3.2.3).

**Desgranulação de PMNs.** A suspensão de PMNs ( $2,5 \times 10^6$  céls/ml) foi pré-incubada durante 15 min a 37°C com AMB (10, 25, 50 e 100 µg/mL), ICPF (25, 50 e 100 µg/mL), veículo (controle) ou salina (NaCl 0,9%). A seguir foi adicionado a citocalasina B (10 µM) e após 5 min a 37°C os leucócitos foram estimulados com fMLP (10 nM). Decorridos 10 min, o material foi centrifugado durante 10 min a 4°C e o sobrenadante obtido, rico em enzimas liberadas pela degranulação leucocitária, foi utilizado nos ensaios enzimáticos realizados segundo metodologia descrita por Úbeda et al. (2002).

**Determinação da atividade da MPO.** Aos 50 µL do sobrenadante foi adicionado PBS (100 µL), tampão fosfato (50 µL) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,012%). Após 5 min a 37 °C foi acrescido 20 µL de 3,3',3,5'-tetrametilbenzidina (TMB, 1,5 mM) e a reação foi interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1,5 M; pH 3,0). A absorbância foi determinada em 620 nm. A construção de uma curva padrão pela adição de quantidades crescentes de MPO (0,125 - 3 U/ml) permitiu relacionar a absorbância com as unidades enzimáticas/ml. Os resultados foram expressos como percentual de inibição da atividade enzimática (ANDREWS & KRINSKY, 1981).

**Determinação da atividade da elastase.** Ao sobrenadante (250  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado 5  $\mu\text{l}$  de Boc-Ala-OphNO<sub>2</sub> (2  $\mu\text{M}$ ). Após 20 min a 37°C foi determinada a absorvância em 348 nm. Para determinação da atividade enzimática foi construída uma curva padrão pelo emprego de quantidades crescentes de p-nitrofenol (10 – 200 nmol/mL). Os resultados foram expressos como percentual de inibição da atividade enzimática (ESCRIG et al., 1997).

### 3.2.5. Hepatotoxicidade e estresse oxidativo induzido por CCL<sub>4</sub> em ratos (HUONG et al., 1998).

Ratos Wistar (150-200g), machos, foram pré-tratados por via oral com AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo (controle), 30 min antes da administração de CCl<sub>4</sub> 50% (i.p.) em óleo de oliva (0,5 ml/kg). Após 48 h os animais foram anestesiados, coletados o sangue e sacrificados por decapitação. O fígado foi removido, lavado com solução salina 0,9% resfriada e homogeneizado.

- **Avaliação da Função Hepática.** As dosagens enzimáticas (alanina transaminase, aspartato transaminase e fosfatase alcalina) no sangue foram realizados de acordo com as orientações do fabricante – Labtest diagnostica ([www. labtest.com.br](http://www.labtest.com.br)).

**Alanina Transaminase (ALT).** É uma enzima produzida pelo fígado e liberada no sangue quando ocorre lesão de células hepáticas. Portanto, a mensuração da alanina transaminase ou transaminase glutâmica pirúvica (ALT/TGP) no sangue é útil para a detecção de lesão celular hepática.

A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD (reação 2). A redução da absorvância em 340 ou 365nm, conseqüente à oxidação da NADH, é monitorizada espectrofotometricamente, sendo diretamente proporcional à atividade da ALT na amostra.

Procedimento: no ensaio em 1,0 ml do reagente de trabalho foi adicionado 0,1 ml da amostra. Após homogeneização a mistura foi transferida para uma cubeta termostatizada a 30 °C e deixada em repouso durante 1 min. Decorrido esse período foi realizada a leitura inicial (A<sub>1</sub>), a qual foi repetida após 2 min (A<sub>2</sub>). A média das diferenças de absorvância por minuto ( $\Delta A/\text{minuto}$ ) foi determinada, e utilizada para calcular o resultado. ALT/TGP (U/L) 340nm =  $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$ .

**Aspartato transaminase (AST).** É uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática, cardíaca, muscular ou cerebral. Assim, a determinação da aspartato transaminase ou transaminase glutâmico oxalacética (AST/GOT) em amostras de sangue é útil na avaliação da função hepática.

A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340 ou 365 nm, determinada por espectrofotometria é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Procedimento: foi realizado de acordo com processo descrito no item anterior, empregando-se o reagente de trabalho adequado para a mensuração da AST.

AST/GOT (U/L) 340nm =  $\Delta A/\text{minuto} \times 1746$ .

- **Análise Histopatológica.** O tecido hepático após fixação em formol aquoso neutro a 10%, foi desidratado com uma seqüência de soluções aquosas contendo etanol 50 – 100% e incluído em parafina. Cortes em seções de 5  $\mu\text{m}$  foram corados com hematoxilina – eosina e observados com auxílio de microscópio ótico.

- **Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático – dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)** (HUONG et al., 1998). Ao homogenato de fígado (0,5 ml) a 10% em KCl 1,15% foi adicionado 0,9 ml de tampão fosfato (50 mM) e 0,5 ml do sistema catalisador de formação de radicais livres, contendo  $\text{FeSO}_4$  (0,01 mM) e ácido ascórbico (0,1 mM). A mistura foi mantida durante 30 min a 37°C e a seguir a reação foi interrompida pela adição do ácido tricloroacético a 10%. A seguir após nova centrifugação (3000 rpm – 15 min) o sobrenadante foi separado e acrescido 1 ml de ácido tiobarbitúrico a 0,8%. A mistura foi mantida em banho de água fervente durante 15 min. Após resfriamento com auxílio de um banho de gelo, foi medida a absorvância em 532nm. Os dados foram calculados a partir de uma curva padrão de malonildialdeído (MDA), um dos produtos tóxicos da peroxidação lipídica, expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

- **Dosagem de catalase no fígado** (AEBI, 1974) O tecido hepático foi homogeneizado em um volume 200 vezes o seu peso com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M - pH 7,0. A seguir o homogenato foi centrifugado a 4°C durante 10 min a 5800 rpm; a fase superior foi desprezada enquanto a fase inferior foi submetida à análise espectrofotométrica

(230 nm). Na cubeta foi adicionado 980 µL de meio de reação (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15%, Tampão Tris-HCl 1 M; EDTA 5 mM pH 8,0; H<sub>2</sub>O Milli-Q), 20µL do amostra diluída (Amostra: tampão (1:200)) e logo a seguir foi determinada a absorvância durante 6 min. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína.

- **Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) – determinação de grupos sulfidrílicos (-SH) não protéicos.** A GSH (L-γ-glutamil-L-cisteinil-glicina) é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular e constitui um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (Meister & Anderson, 1983).

O nível de GSH foi determinado através do método de Ellman (1959) ligeiramente modificado. Para tanto, ao homogenato de fígado (400 µl) a 10% em EDTA 0,02 M, foi acrescido 320 µl de água destilada e 80µl de ácido tricloroacético a 50%. Após centrifugação, 3000 rpm durante 15 min a 4°C, foi retirada uma alíquota do sobrenadante (400 µl) e acrescido Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 (800 µl) e DTNB 0,01 M (20 µl). A leitura espectrofotométrica (420 nm) foi realizada 1 min após a adição do DTNB. Os dados foram calculados a partir de uma curva padrão de GSH e expressos em µg/mg de proteína.

- **Determinação do conteúdo de proteína.**

Foi utilizada a metodologia descrita por Lowry et al. (1951). A reação consiste na hidrólise alcalina das proteínas com posterior reação com o reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu, em solução contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200 mM, NaOH 100 mM, tartarato de sódio e potássio 1 mM e sulfato de cobre 20 mM. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 750 nm e os valores obtidos foram comparados à curva padrão de albumina.

### **3.2.6. Avaliação do efeito do ICPF sobre contratilidade da musculatura lisa traqueal de cobaia**

Cobaias (350 – 450g) foram inicialmente anestesiadas pela inalação de éter e a seguir, colocados na posição de decúbito dorsal para a excisão da traquéia. A região cérvico-torácica anterior foi aberta cirurgicamente e a traquéia foi então, removida cuidadosamente e levada a uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit aerada, onde foi feita a remoção do tecido conectivo. Após a remoção da traquéia os animais foram sacrificados por exsanguinação, através de secção da artéria aorta abdominal. Segmento da traquéia, com aproximadamente 3-4 mm de comprimento foi montado em cuba para órgão isolado com capacidade de 7 ml contendo solução de Krebs-Henseleit aerada com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> e

mantida a 37 °C (CASTILLO & DE BEER, 1947). A traquéia foi submetida a tensão de 1 gF e as respostas isométricas foram registradas no polígrafo (Narco Bio Systems Inc., USA) por intermédio de um transdutor de força (F-60). Durante o período (60 min) de equilíbrio da preparação, a solução de Krebs-Henseleit foi renovada a cada 15 min. Nos experimentos realizados com traquéia sem epitélio, o tecido epitelial foi removido delicadamente com auxílio de uma haste de algodão, e o procedimento foi avaliado por análise histológica e pela resposta contrátil à bradicinina (1  $\mu$ M) (Folkerts & Nijkamp, 1998). Todo o estudo foi realizado na presença de indometacina (3  $\mu$ M), para prevenir a resposta neural resultante da produção de prostaglandinas endógena. Em alguns experimentos foram adicionados à solução Krebs-Henseleit fentolamina (10  $\mu$ M) e propranolol (1  $\mu$ M) para inibir a resposta  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgica.

- **Procedimento experimental.** A traquéia com ou sem epitélio foi pré-contraída com carbacol (CCh, 30 ou 100  $\mu$ M, 70 – 90% da contração máxima) ou KCl (40 mM, 49% da contração máxima, e 120 mM). Logo após a contração sustentada tornar-se estável, aproximadamente 10 min, foram adicionadas ao banho concentrações crescentes de ICPF (10 – 100  $\mu$ M) ou AMB (10 – 1000  $\mu$ M) utilizando o método cumulativo (VAN ROSSUM, 1963). O relaxamento foi expresso como percentual da contração máxima induzida pelo CCh ou KCl. A teofilina, bloqueador não seletivo de fosfodiesterase, foi utilizada como padrão.

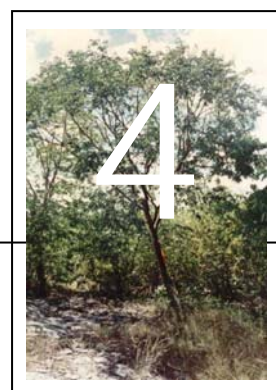
Para investigar o possível mecanismo de ação miorelaxante do ICPF, a traquéia com epitélio foi incubada 20 min antes da adição do agonista com as seguintes drogas: L-NAME (antagonista competitivo da óxido nítrico sintase, 100  $\mu$ M), ODQ (inibidor seletivo da guanilato ciclase, 3 and 33  $\mu$ M), propranolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, 1  $\mu$ M), capsaicina (agente dessensibilizante e excitatório dos neurônios sensoriais aferentes, 3  $\mu$ M), 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador seletivo dos canais de  $K^+$  voltagem dependente, 100  $\mu$ M), iberiotoxina (IbTX, bloqueador seletivo do canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$ , 0,1  $\mu$ M) ou glibenclamida (bloqueador dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP, 33  $\mu$ M). Indometacina e fentolamina foram dissolvidas em etanol, com a concentração final no banho de 0,004%. As demais drogas foram dissolvidas em água destilada ou Tween 80 (concentração final não excedeu a 0,05%). O ICPF foi dissolvido numa solução aquosa de Tween 80 4%, e a concentração final não excedeu a 0,24%.

### **3.2.7. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 4.0 (USA). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM.) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student, comparação entre duas médias, ou análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. As CE<sub>50</sub> (concentração efetiva do ICPF que equivale a 50% da resposta máxima) obtidas foram comparadas através da média geométrica dos experimentos individuais para um intervalo de confiança (I.C.) de 95%. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

# RESULTADOS

---



#### 4. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram divididos em quatro partes: 1) Avaliação preliminar das possíveis toxicidades do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de *Amburana cearensis* A.C.Smith em camundongos ou ratos; 2) Determinação das atividades antiinflamatórias do ICPF e do AMB em ratos ou camundongos; 3) Avaliação da atividade hepatoprotetora/antioxidante do AMB em ratos e 4) Determinação dos efeitos do ICPF e do AMB sobre a contratilidade do músculo liso traqueal de cobaias.

##### 4.1. Avaliação preliminar das toxicidades do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de *Amburana cearensis* A.C. Smith

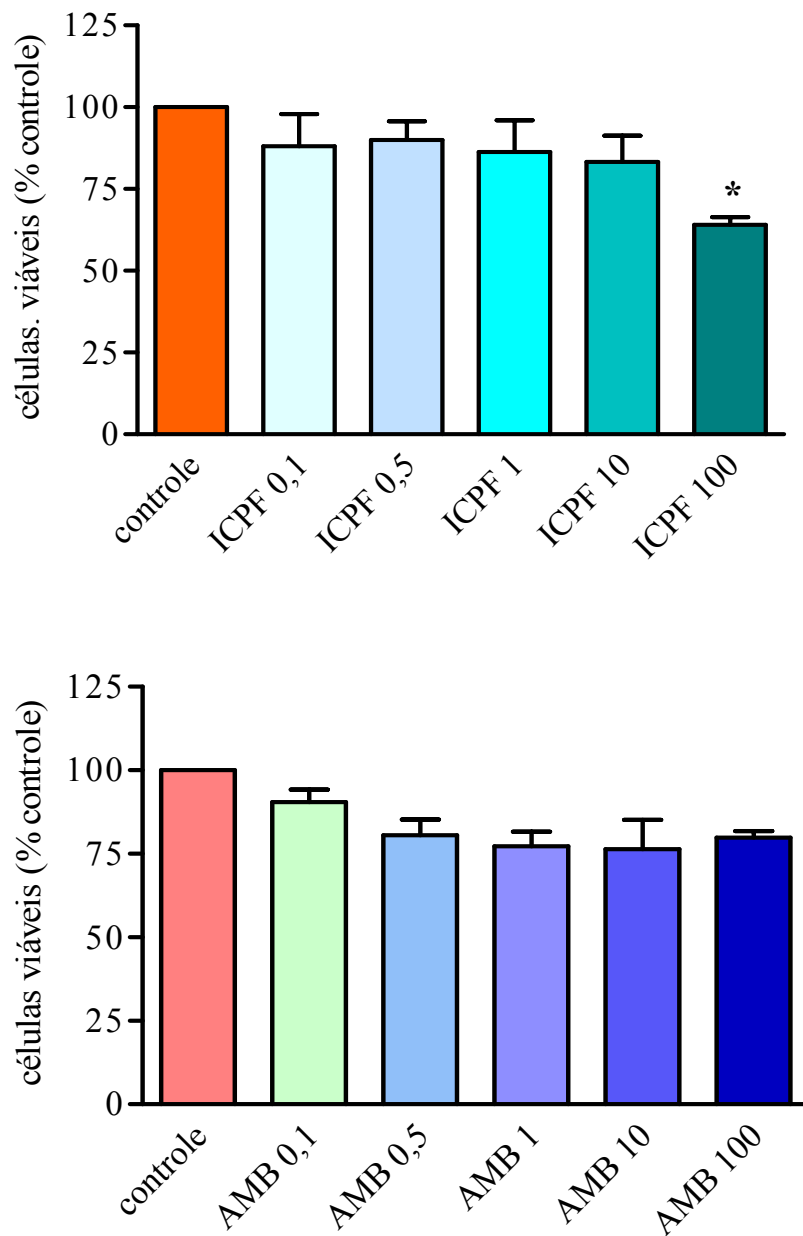
- **Efeitos gerais do ICPF e do AMB - teste hipocrático em camundongos**

Camundongos de ambos os sexos (n= 10) tratados com ICPF (50 e 100 mg/kg, i.p.) ou AMB (50 e 100 mg/kg, i.p.) em doses únicas, apresentaram comportamento normal durante todo o período de observação, 3 dias, em relação ao grupo controle (veículo). Porém, a administração de ICPF na maior dose (200 mg/kg, i.p.) causou mudança na coloração da urina (amarelo mais intenso) em 20% dos animais tratados, analgesia e diminuição da atividade motora, sugerindo um possível efeito depressor do sistema nervoso central. A mudança na coloração da urina está possivelmente relacionada à coloração da solução do ICPF, 3-metilflavonol, que possui coloração amarelada. Os animais tratados com a maior dose de AMB (200 mg/kg, i.p.) apresentaram também analgesia, observada pela ausência de reação ao prensamento da cauda. Nas doses investigadas tanto o ICPF quanto o AMB não causaram a morte dos animais.

- **Avaliação das citotoxicidades do ICPF e do AMB em hepatócitos de ratos.**

Na **Figura 11** pode ser observado que a adição do ICPF em concentrações crescentes (0,1; 0,5; 1; 10 e 100 µg/ml) à cultura primária de hepatócitos causou redução (36 %) significativa da viabilidade celular apenas na maior concentração. O AMB (0,1; 0,5; 1; 10 e 100 µg/ml) por sua vez, reduziu apenas de 10 a 23,6 % a viabilidade celular, apresentando assim uma baixa citotoxicidade para células hepáticas.





**Figura 11.** Avaliação da citotoxicidade do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) em hepatócitos de ratos. As células foram cultivadas durante 4 dias. O ICPF ou AMB nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 10 e 100 µg/ml (0,237 – 237 µM) foram adicionados ao meio e 24 h depois a viabilidade celular foi determinada pelo teste do MTT. Os valores estão expressos como média ± E.P.M das análises realizadas em sextuplicata e repetidas em três dias diferentes. Os resultados obtidos na presença das drogas testes foram comparados em relação ao controle (\*  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

#### 4.2. Determinação das atividades antiinflamatórias do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de *Amburana cearensis* A.C. Smith

4.2.1. *Modelo do edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios, incluindo estudo histopatológico, avaliação morfométrica e avaliação da permeabilidade vascular em ratos ou camundongos*

- **Edema de pata induzido por carragenina**

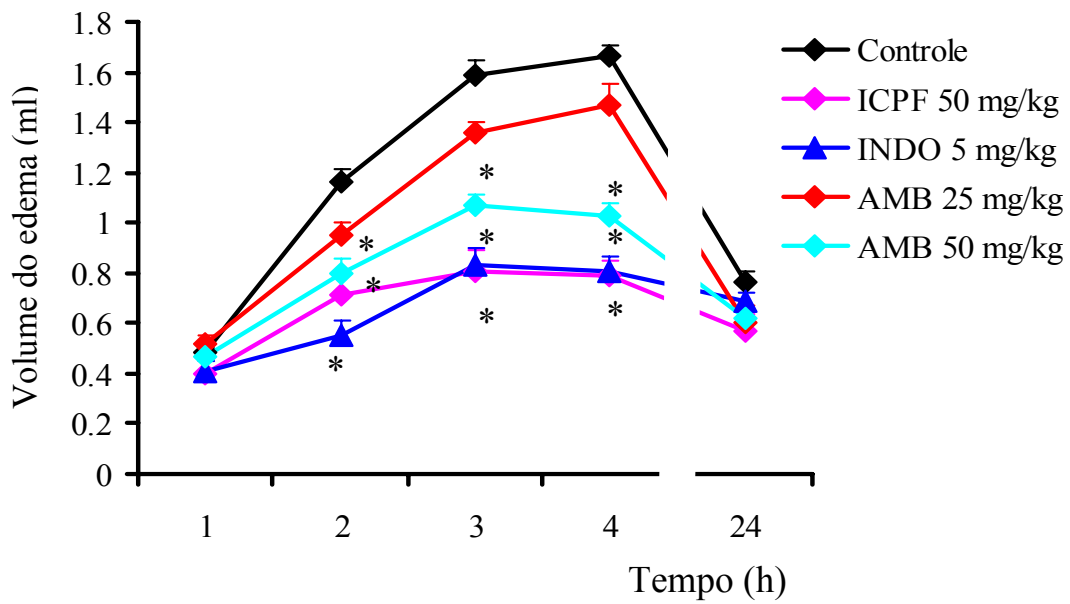
O pré-tratamento de ratos Wistar com ICPF (50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o volume (ml) do edema de pata na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora após a administração de carragenina ( $0,71 \pm 0,09$ ;  $0,81 \pm 0,06$  e  $0,79 \pm 0,06$  ml respectivamente) em relação ao controle ( $1,16 \pm 0,05$ ;  $1,59 \pm 0,06$ ;  $1,66 \pm 0,04$  ml respectivamente) correspondendo a inibições de 39, 49 e 52 % respectivamente. O AMB na menor dose (25 mg/Kg, i.p.) não inibiu o edema, porém na dose de 50 mg/kg, causou inibições de até 38 % em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados nos animais pré-tratados com indometacina (5 mg/kg, i.p.), utilizada como droga padrão (**Figura 12**).

No exame histopatológico (**Figura 13**) da pata dos animais do grupo controle (veículo) percebe-se uma reação inflamatória aguda, com edema representativo além de uma intensa infiltração de neutrófilos, presente em maior número na derma profunda. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada no grupo não tratado com carragenina, apenas salina (NaCl 0,9%). O pré-tratamento dos animais com o ICPF, AMB ou indometacina, antiinflamatório não esteroideal, causou uma redução no edema e na celularidade, confirmando os resultados do ensaio anterior.

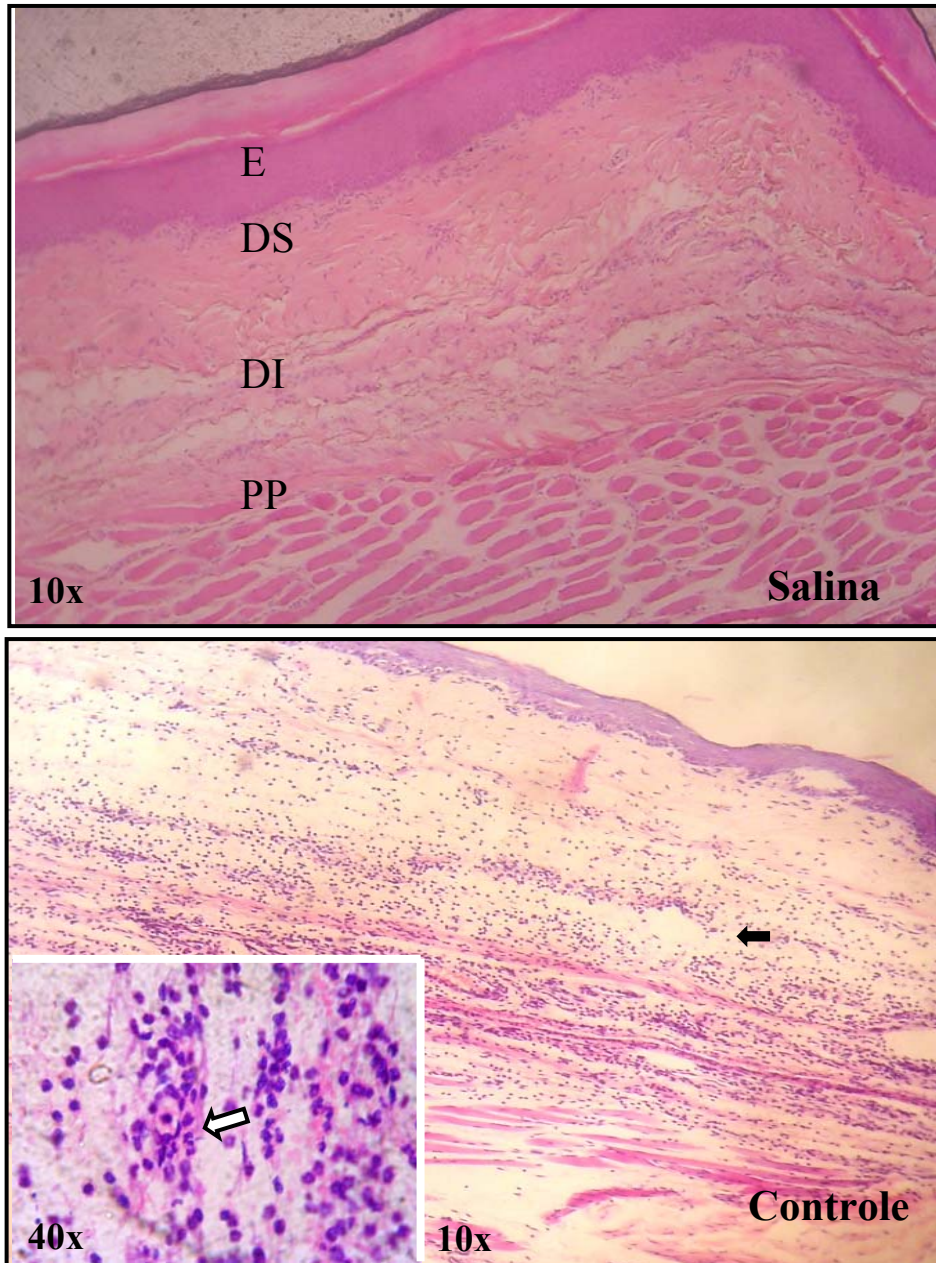
Pela avaliação morfométrica (número de células/campo) da pata dos animais verificou-se que o ICPF (50 mg/kg, i.p.), AMB (50 mg/kg, i.p.) e a indometacina (5 mg/kg, i.p.) reduziram em 39, 50 e 44% respectivamente a celularidade, predominantemente de neutrófilos, na derma profunda (**Figura 14**).

- **Edema de pata induzido por dextrano**

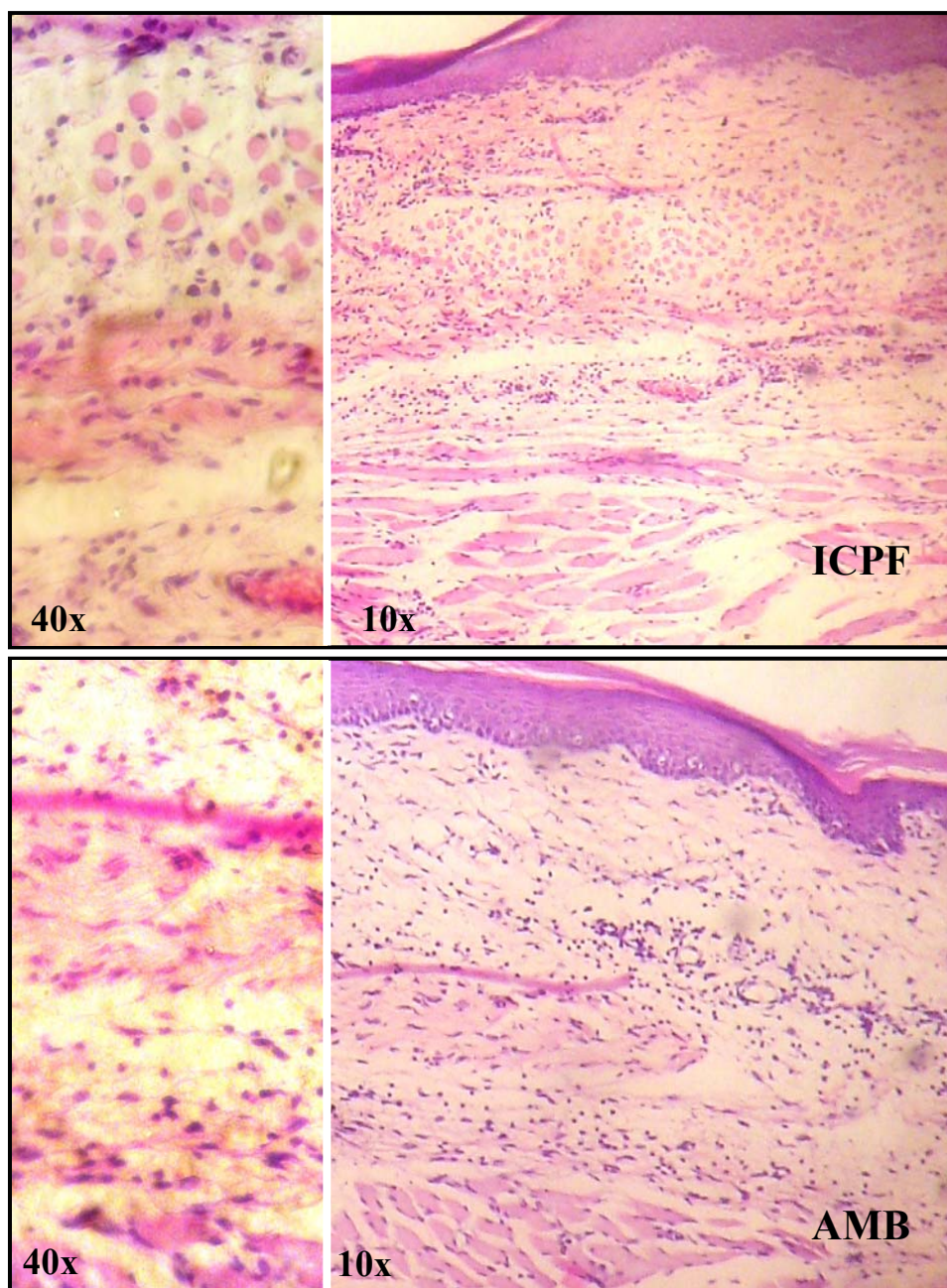
O pré-tratamento dos animais com AMB (25 e 50 mg/kg) interferiu tanto no edema de pata quanto no extravasamento vascular induzido por dextrano em camundongos (**Figura 15**). O AMB administrado por via oral na maior dose (50 mg/kg) inibiu em 46 e 51 % o edema e o extravasamento vascular respectivamente em relação aos controles, pré-tratados com veículo e dextrano 2h antes das avaliações. Enquanto, no pré-tratamento por



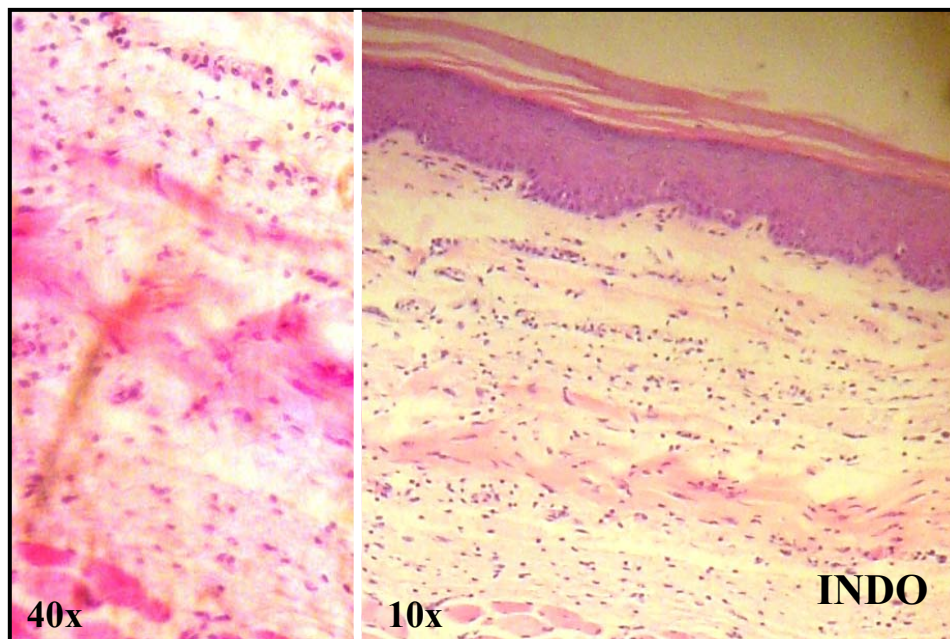
**Figura 12.** Atividade antiedematogênica do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Ratos Wistar (120-180 g) foram tratados por via intraperitoneal com ICPF, AMB, indometacina (INDO) ou veículo (controle) 30 min antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina a 1% na pata traseira, direita do animal. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. controle (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



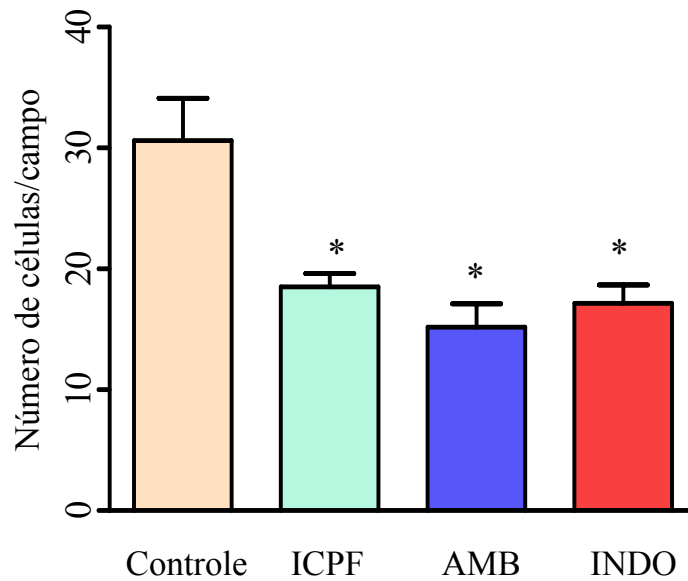
**Figura 13a.** Micrografia ilustrando os efeitos do isocampferídio (ICPF), amburosídeo (AMB) e indometacina (INDO) sobre o edema de pata induzido por carragenina (Cg) em ratos. Coloração hematoxilina e eosina. No grupo salina, animais foram tratados apenas com salina, observa-se uma aparência normal, com epitélio (E) e diversos planos incluindo derma superficial (DS), derma intermediária (DI) e plano profundo (PP) (derma profundo, plano muscular e tecido adiposo). Enquanto no grupo controle(veículo + Cg) se percebe a diferença nos diversos planos em relação ao grupo NT, com edema (seta preta) e intensa celularidade predominantemente neutrófilos (seta branca) (aumento 40x).



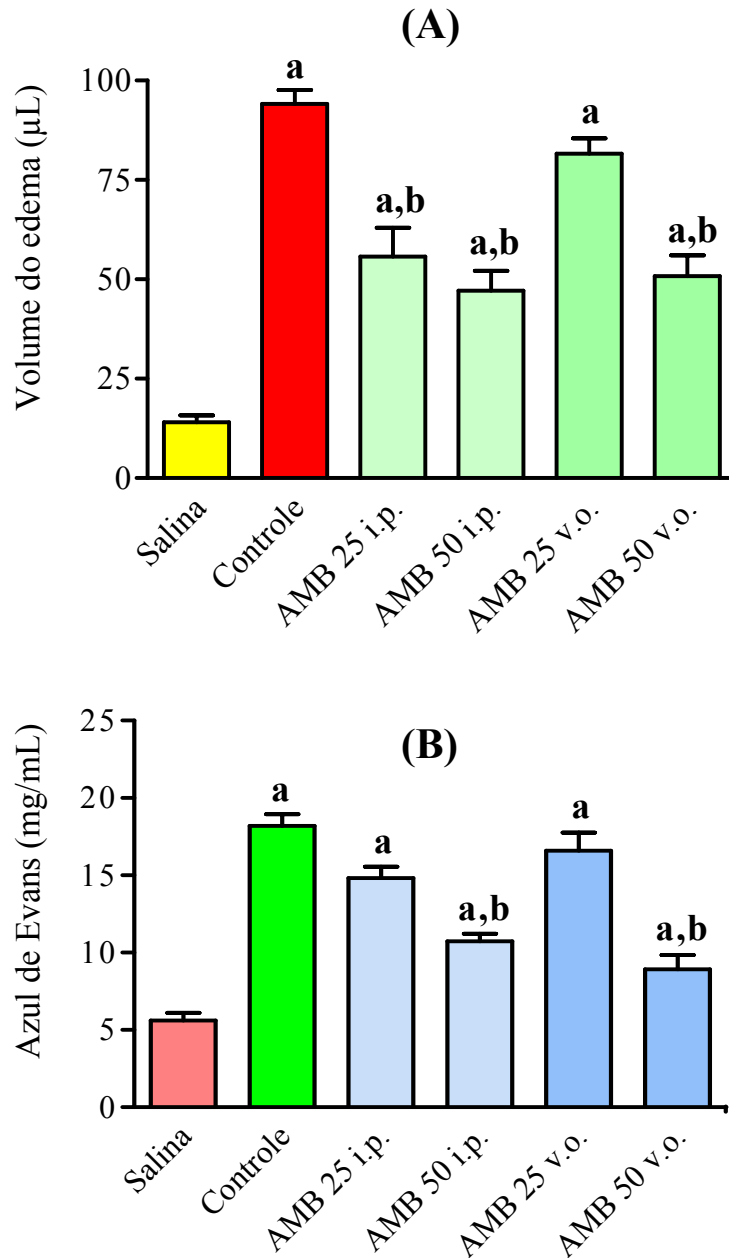
**Figura 13b.** Os tratamentos dos animais com ICPF (50 mg/kg, i.p.) bem como com AMB (50mg/kg, i.p.) causaram reduções no edema (aumento 10x) e no número de células no plano profundo melhor observada em maior aumento (40x). Coloração HE.



**Figura 13c.** Resultado semelhante foi observado para o grupo tratado com indometacina (INDO, 5 mg/kg, i.p.) com inibição do edema (aumento 10x) e do acúmulo de células no plano profundo melhor observado em maior aumento (40x). Coloração HE.



**Figura 14.** Avaliação morfométrica da migração de leucócitos induzida por carragenina (Cg) na pata de rato, considerando o efeito do isocampferídio (ICPF), amburosídeo A (AMB) e indometacina (INDO). Ratos Wistar (120-180g) foram tratados por via intraperitoneal com ICPF (50 mg/kg), AMB (50 mg/kg), INDO (5 mg/kg) ou veículo (controle) 30 min antes da injeção de Cg a 1%. No grupo não tratado com carragenina, apenas salina, não foram observados granulócitos. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. controle (teste “t” de Student).



**Figura 15.** Efeito do ambrosídio A (AMB) sobre o edema de pata (A) e o extravasamento vascular (B) induzidos por dextrano (Dx) em camundongos. Camundongos Swiss (30 - 35g) foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.) com AMB ou veículo (controle) antes da injeção intraplantar da solução de Dx a 10% na pata do animal. O grupo salina compreende os animais que não foram administrados dextrano, apenas salina. As avaliações foram realizadas 2 h após a injeção do Dx. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. **a** vs salina, **b** vs controle ( $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



via intraperitoneal o AMB causou reduções em torno de 45% no volume do edema, e no extravasamento vascular inibiu em até 41 % em relação aos controles.

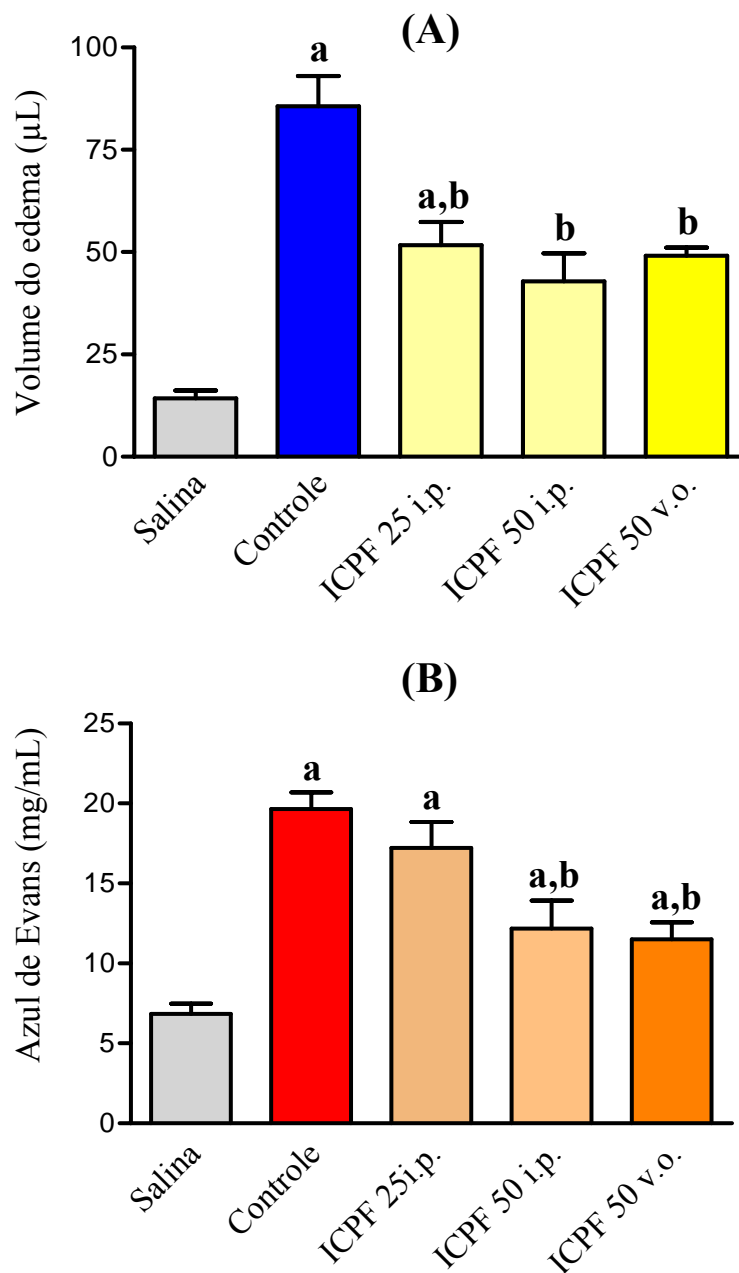
A **Figura 16** mostra que o pré-tratamento dos animais com ICPF (25 e 50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente também o edema induzido pelo dextrano ( $51,7 \pm 5,7$  e  $42,8 \pm 6,8$   $\mu$ l respectivamente) em relação ao controle ( $85,7 \pm 7,4$   $\mu$ l), com inibições de 39 e 50 % respectivamente. No extravasamento vascular redução significativa foi observada apenas para a maior dose. A administração oral do ICPF (50 mg/kg) inibiu tanto o edema (43 %) quanto o extravasamento vascular (41 %) induzidos pelo dextrano.

Com base nos resultados obtidos passamos a investigar o efeito do ICPF e do AMB sobre o edema de pata induzido por mediadores inflamatórios (prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina, serotonina e bradicinina) envolvidos nos processos inflamatórios investigados.

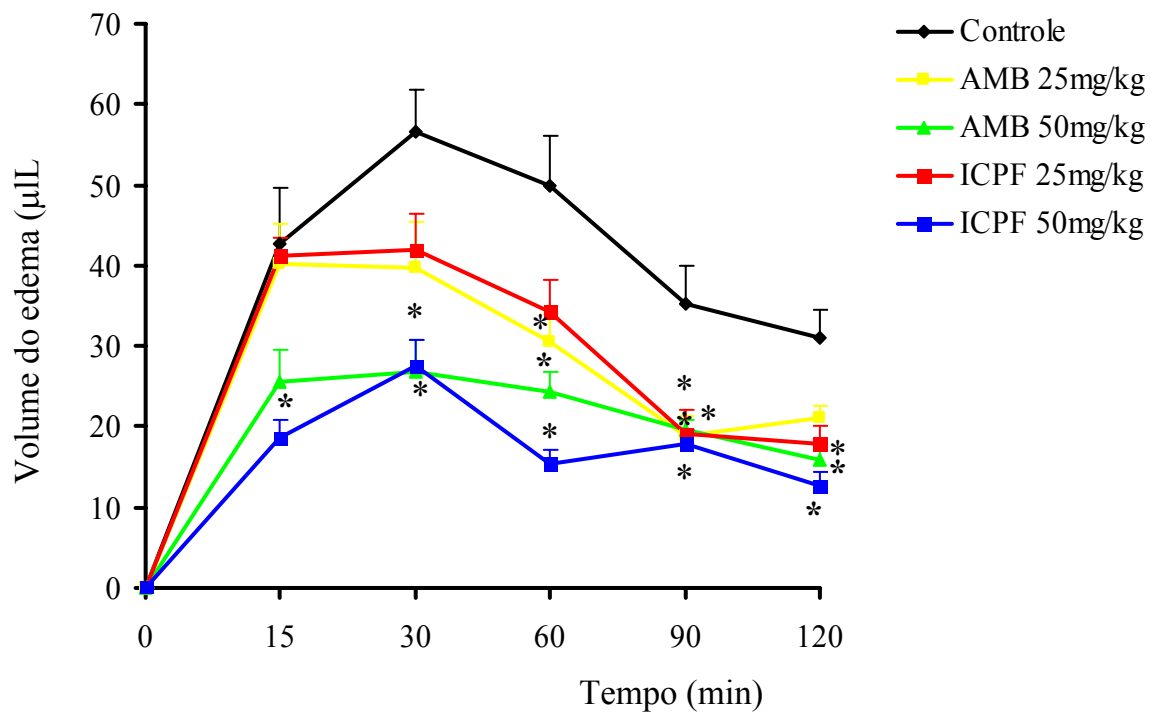
- **Edema de pata induzido por prostaglandina E<sub>2</sub>, histamina, serotonina e bradicinina**

A **Figura 17** mostra o efeito do ICPF e do AMB sobre o edema de pata induzido pela Prostaglandina E<sub>2</sub> – PGE<sub>2</sub>. Observa-se que o ICPF na maior dose (50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o edema aos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de PGE<sub>2</sub> ( $18,5 \pm 2,4$ ;  $27,5 \pm 3,3$ ;  $15,5 \pm 1,6$ ;  $17,8 \pm 1,8$  e  $12,6 \pm 1,7$   $\mu$ l, respectivamente), quando comparado ao controle (veículo e PGE<sub>2</sub>) nos mesmos períodos de tempos ( $42,78 \pm 6,8$ ;  $56,7 \pm 5,1$ ;  $50,0 \pm 6,0$ ;  $35,3 \pm 4,6$  e  $31,0 \pm 3,5$   $\mu$ l, respectivamente), causando inibições de 49 a 69%. O AMB (50 mg/kg, i.p.), reduziu também o volume do edema significativamente nos períodos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção de PGE<sub>2</sub>, com inibições de 53; 51; 45 e 49 % respectivamente. Na dose de 25 mg/Kg, i.p. o ICPF e AMB reduziram significativamente o edema em parte dos períodos estudados, porém em menor grau.

No caso do ICPF (12,5 e 25 mg/kg, i.p.) doses menores já foram suficientes para reduzir o edema de pata induzido por histamina. Na maior dose o ICPF causou reduções significativas do edema aos 15, 30 e 60 minutos após a injeção de histamina ( $12,3 \pm 1,8$ ;  $18,0 \pm 2,9$  e  $15,7 \pm 1,8$   $\mu$ l respectivamente) em relação ao controle ( $48,7 \pm 3,4$ ;  $54,6 \pm 3,4$  e  $34,3 \pm 2,5$   $\mu$ l respectivamente) correspondendo a inibições de 75, 67 e 54 % respectivamente. Enquanto, na menor dose o ICPF causou também reduções significativas do edema em parte dos períodos avaliados. Em relação ao pré-tratamento dos animais com o AMB, a dose de 25 mg/kg inibiu o edema apenas aos 15 minutos ( $31,1 \pm 4,0$   $\mu$ l) após a injeção de histamina em relação ao controle, enquanto na dose de 50 mg/kg ocorreram



**Figura 16.** Efeito do isocampferídio (ICPF) sobre o edema (A) e o extravasamento vascular (B) induzidos por dextrano (Dx) em camundongos. Camundongos Swiss (30 - 35g) foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.) com ICPF ou veículo (controle) antes da injeção intraplantar da solução de dextrano a 10% na pata traseira, direita do animal. O grupo salina compreende os animais que não foram administrados dextrano, apenas salina. As avaliações foram realizadas 2 h após a injeção do Dx. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs salina, **b** vs controle ( $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 17.** Atividade antiedematogênica do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) sobre o edema de pata induzido por Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>, 30 nmol/animal) em camundongos. Camundongos Swiss (25-30 g) foram pré-tratados por via intraperitoneal com ICPF, AMB ou veículo (controle) 30 min antes da injeção intraplantar da solução de PGE<sub>2</sub> (30 nmol/animal, 50 µl) na pata traseira, direita do animal. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \*p<0,05 vs controle (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

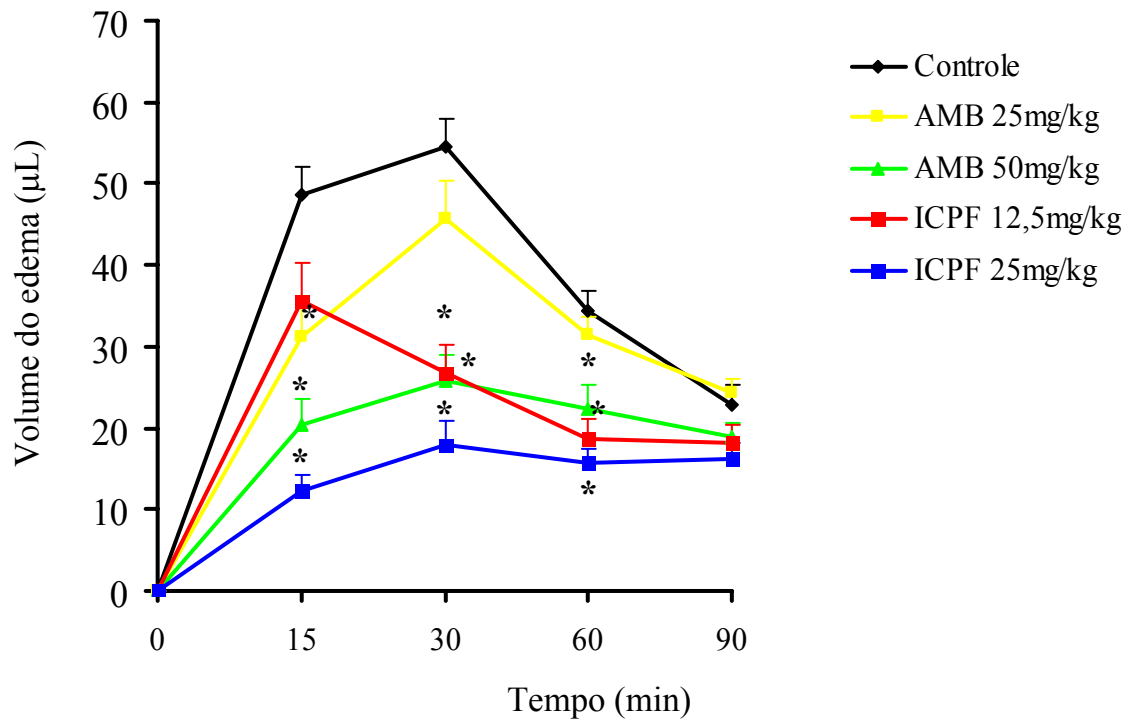
Na avaliação dos efeitos antiedematogênicos do ICPF e do AMB no edema de pata induzido por serotonina (**Figura 19**), o ICPF (25 mg/kg, i.p.) e o AMB (50 mg/kg, i.p.) inibições de 35 a 58% verificadas em diferentes períodos (15, 30 e 60 minutos) após a injeção de histamina (**Figura 18**). apresentaram perfis de inibições semelhantes àqueles observado no edema induzido por histamina, com inibições em torno de 64 e 45% respectivamente. O ICPF e o AMB na dose investigada (50 mg/kg, i.p.) não interferiram no edema induzido pela bradicinina (**Figura 20**).

#### 4.2.2. Peritonite induzida por carragenina ou fMLP em camundongos

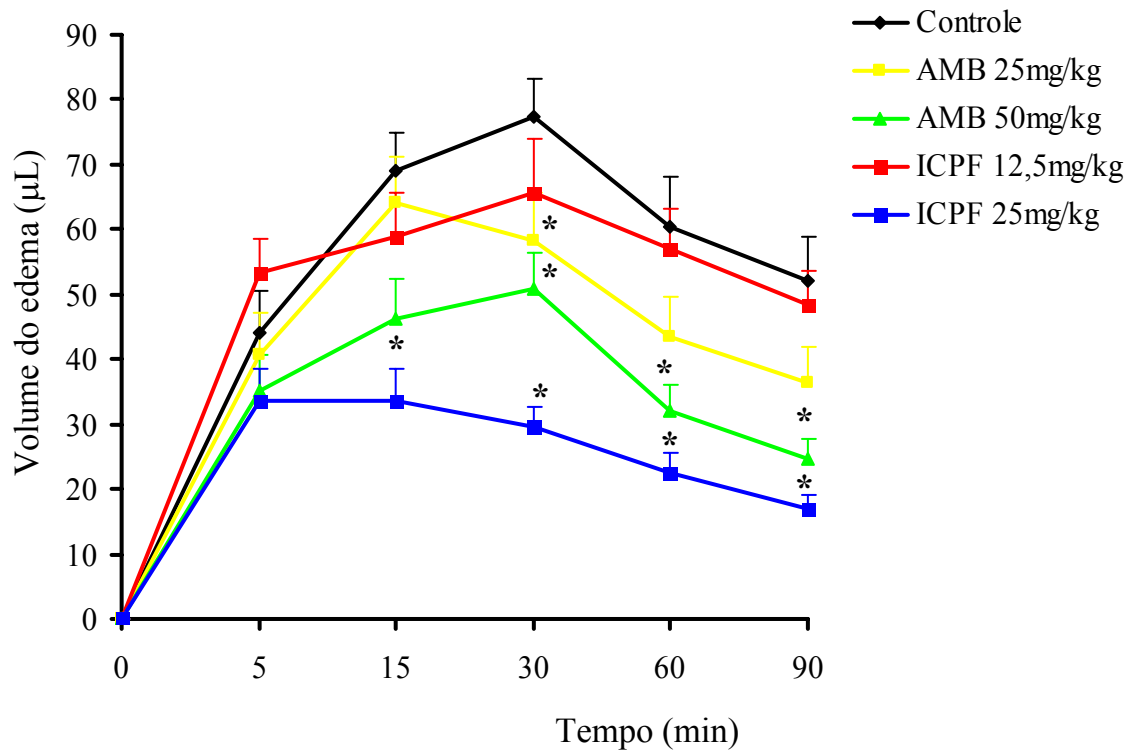
Os efeitos do ICPF e do AMB sobre a migração de leucócitos ( $\times 10^6$  céls/ml) induzida por carragenina estão representados na **Figura 21**. A administração de carragenina induziu um aumento significativo no número de leucócitos totais ( $5,17 \pm 0,41$ ) e neutrófilos ( $4,18 \pm 0,34$ ) em relação ao grupo não tratado com carragenina, apenas salina (leucócitos totais:  $1,15 \pm 0,11$ ; neutrófilos:  $0,26 \pm 0,04$ ). Porém, o pré-tratamento dos animais com ICPF (25 e 50 mg/kg, i.p.) reduziu o infiltrado celular tanto com relação ao número de leucócitos totais ( $2,14 \pm 0,28$  e  $1,87 \pm 0,16$  respectivamente) quanto ao número de neutrófilos ( $1,51 \pm 0,2$  e  $0,95 \pm 0,13$  respectivamente) correspondendo a inibições de 58,6 e 64 % respectivamente para leucócitos, e de 64 e 77 % respectivamente para neutrófilos, em relação ao grupo tratado apenas com carragenina. O pré-tratamento com ICPF por via oral (50 mg/kg) reduziu em 40 e 52 % o número de leucócitos e de neutrófilos respectivamente no foco inflamatório.

O AMB (25 e 50 mg/kg) administrado por via oral ou intraperitoneal reduziu significativamente o infiltrado de leucócitos no foco inflamatório. Na maior dose (v.o. e i.p.) as reduções nos números de leucócitos ( $2,56 \pm 0,23$  e  $1,85 \pm 0,21$  respectivamente) e de neutrófilos ( $1,59 \pm 0,27$  e  $1,16 \pm 0,19$  respectivamente) corresponderam a inibições de 50 e 64 % respectivamente para leucócitos, e 62 e 72 % respectivamente para neutrófilos. A dexametasona (5 mg/kg, v.o.) reduziu significativa-mente, tanto o número de leucócitos ( $1,96 \pm 0,23$ ) quanto o de neutrófilos ( $0,81 \pm 0,02$ ) no foco inflamatório.

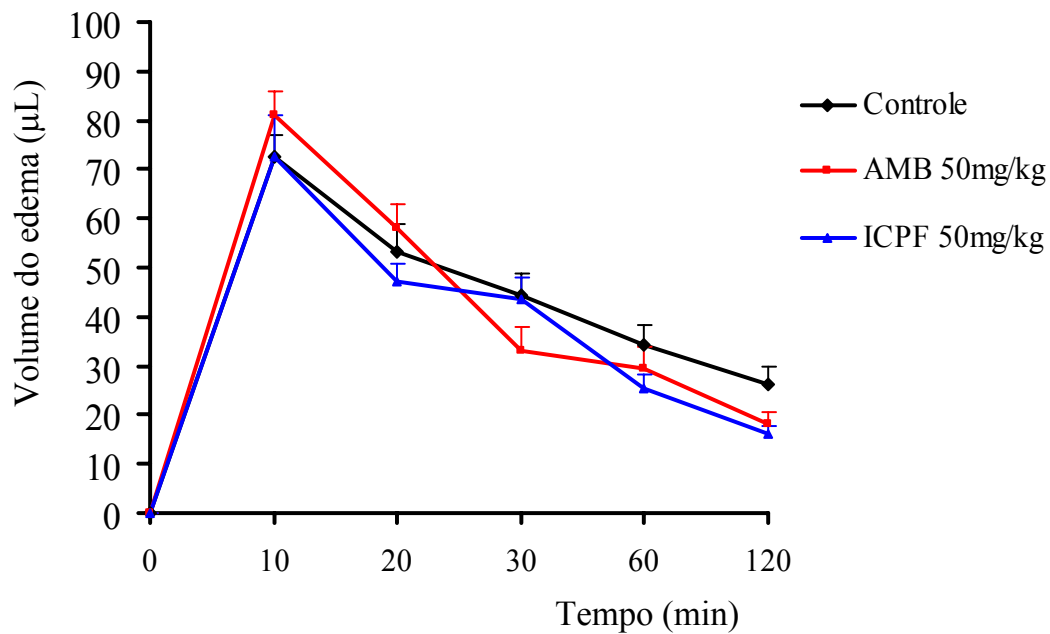
Na **Figura 22** pode ser observado que o ICPF (50 mg/kg, i.p.) inibiu significativamente a migração de leucócitos totais ( $0,62 \pm 0,05$ ) e neutrófilos ( $0,27 \pm 0,04$ ) induzida pelo fMLP, em 58 e 74 % respectivamente quando comparado ao controle (leucócitos totais:  $1,5 \pm 0,07$ ; neutrófilos:  $1,06 \pm 0,11$ ). Na dose menor (25 mg/kg, i.p.) o ICPF não promoveu redução significativa na migração celular. A administração oral de



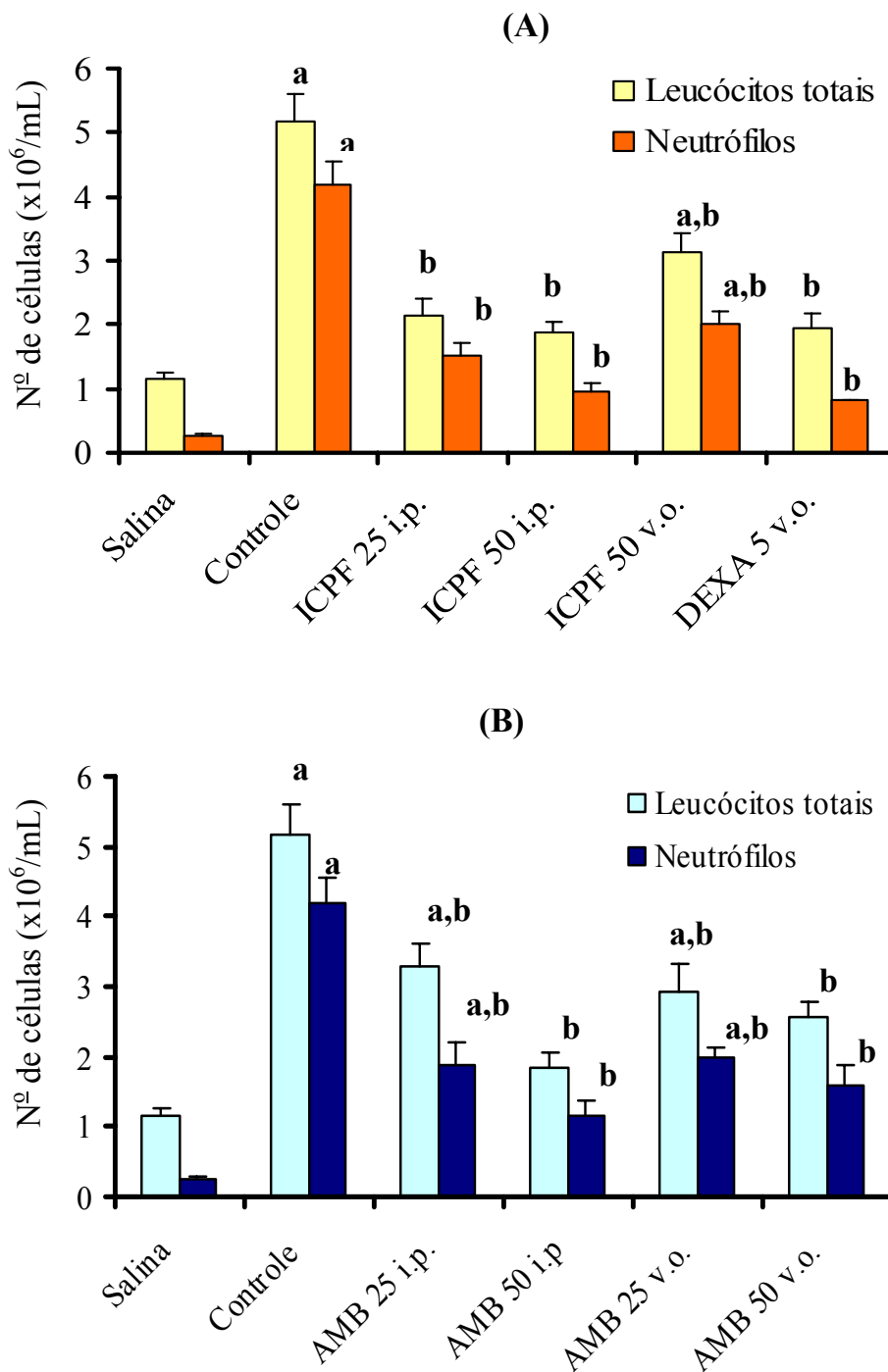
**Figura 18.** Atividades antiedematogênicas do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de *Amburana cearensis* sobre o edema de pata induzido por histamina em camundongos. Camundongos Swiss (25 – 30 g) foram tratados por via intraperitoneal com ICPF, AMB ou veículo (controle) 30 min antes da injeção intraplantar da solução de histamina (200 µg/animal, 50 µL) na pata traseira, direita do animal. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. controle (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 19.** Atividades antiedematogênicas do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) sobre o edema de pata induzido por serotonina em camundongos. Camundongos Swiss (25-30 g) foram tratados por via intraperitoneal com ICPF, AMB ou veículo (controle) 30 min antes da injeção intraplantar de serotonina (200 µg/animal, 50 µL) na pata traseira, direita do animal. Os valores representam a média ± E.P.M. de 8 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. controle (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

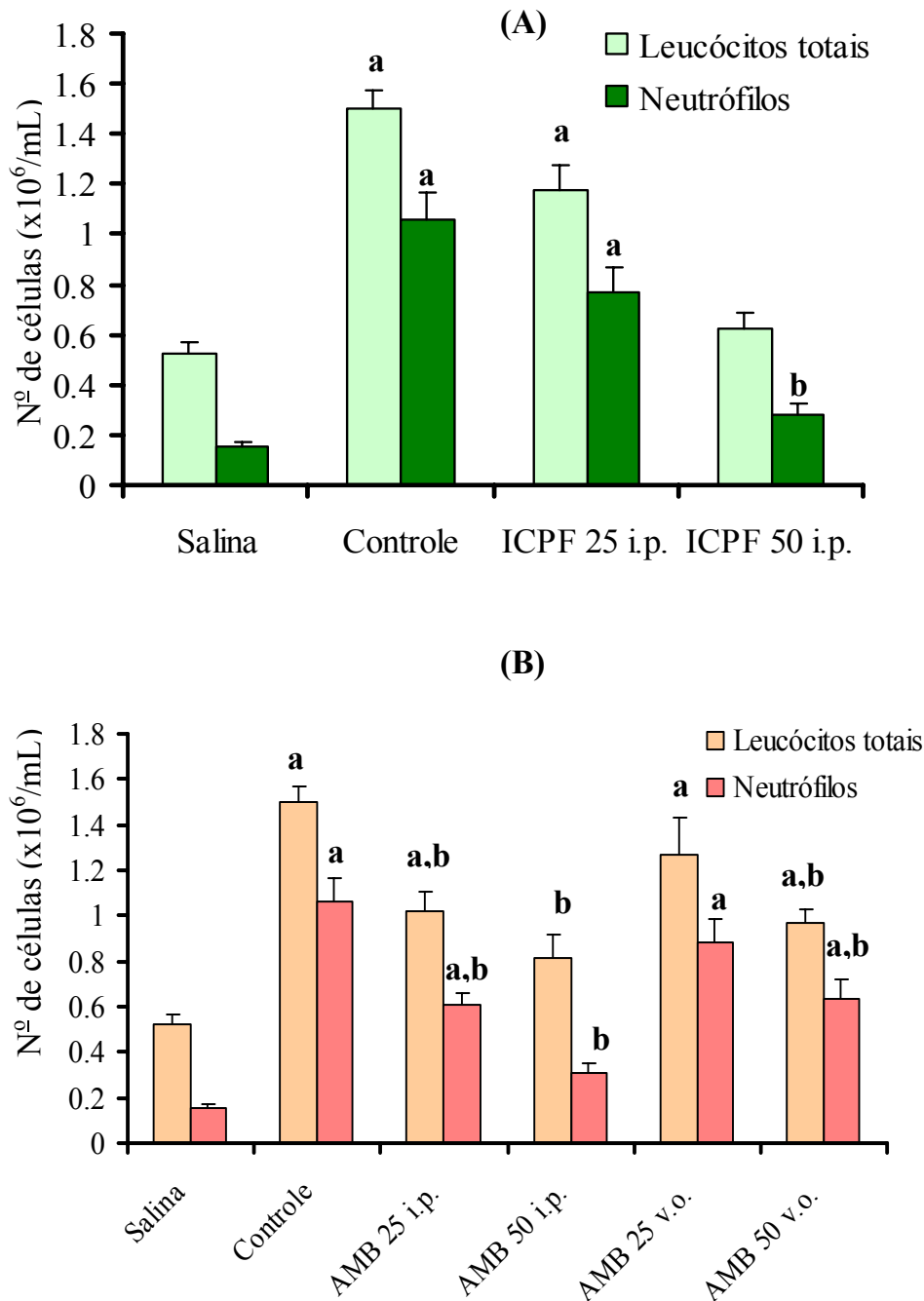


**Figura 20.** Avaliação dos efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) sobre o edema de pata induzido por bradicinina em camundongos. Camundongos Swiss (25 - 30 g) foram tratados por via intraperitoneal com ICPF, AMB ou veículo (controle) 30 min antes da injeção intraplantar da solução de bradicinina (3 nmol/animal, 50 µL) na pata traseira, direita do animal. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo. Os grupos tratados foram comparados em relação ao controle (Teste “t” de Student).



**Figura 21.** Efeitos do isocampferídio (ICPF) (A) e do amburosidio A (AMB) (B) na migração de leucócitos induzida por carragenina (Cg) na cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.) com ICPF, AMB, dexametasona (Dexa) ou veículo (controle) 30 ou 60 min antes da administração de carragenina a 1%. Salina, compreende o grupo de animais não tratado com Cg, apenas com salina (NaCl 0,9 %). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 – 16 animais por grupo, **a** vs salina, **b** vs controle ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).





**Figura 22.** Efeitos do isocampferídio (ICPF) (A) e do amburosidio A (AMB) (B) na migração de leucócitos induzida por fMLP na cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.) com ICPF, AMB ou veículo (controle) 30 ou 60 min antes da administração do fMLP ( $10^{-4}$  M). Salina (A) preenche o grupo de animais não tratado com fMLP, apenas salina (NaCl 0,9%). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 animais por grupo, **a** vs salina, **b** vs controle ( $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

AMB bloqueou a migração de leucócitos totais ( $0,96 \pm 0,05$ ) e neutrófilos ( $0,63 \pm 0,08$ ) apenas na maior dose (50 mg/kg). Entretanto, a administração intraperitoneal de AMB (25 e 50 mg/kg) inibiu significativamente a migração de leucócitos (32 e 45 % respectivamente) e de neutrófilos (42 e 71 % respectivamente) induzida pelo fMLP.

#### *4.2.3. Efeito do ICPF e do AMB na desgranulação de neutrófilos induzida pelo fMLP em sangue humano: atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase*

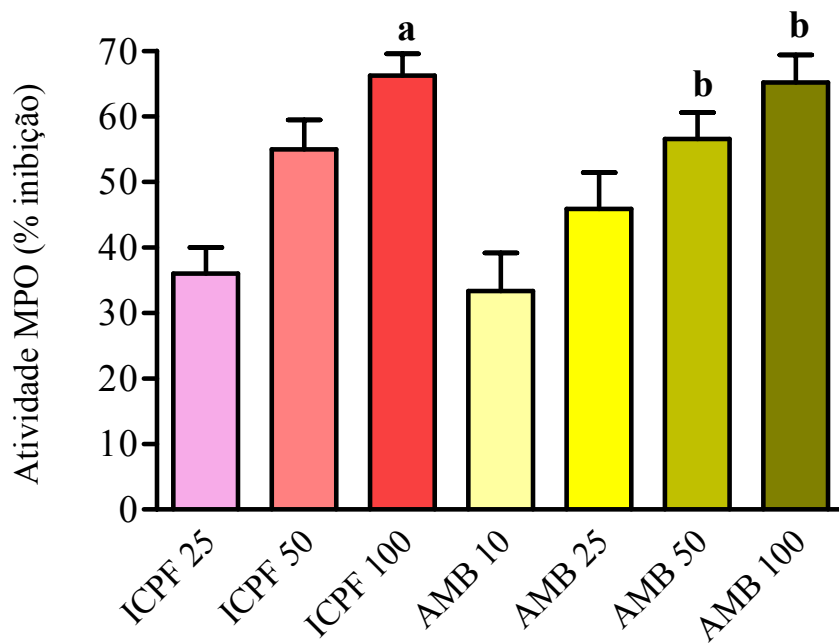
A inibição da liberação de enzimas como mieloperoxidase (MPO) e elastase por neutrófilos é indicativo de um efeito antiinflamatório. Na **Figura 23** observa-se que a incubação de leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos com o ICPF (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu em até 66 % a atividade da MPO liberada por neutrófilos estimulados pelo fMLP. Enquanto o AMB na concentração de 10; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$  também reduziu em 33, 46, 56 e 65 % respectivamente a atividade da MPO.

A atividade enzimática da elastase foi determinada pela formação de p-nitrofenol, produto da ação da elastase sobre o Boc-Ala-OphNO<sub>2</sub> (substrato). O ICPF nas concentrações de 10, 25 e 50  $\mu\text{g/ml}$  inibiu a atividade da elastase, em 27, 50 e 44 % respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos com o AMB (10, 25 e 50  $\mu\text{g/ml}$ ) que inibiu em 34, 48 e 52 % a atividade da elastase liberada por neutrófilos estimulados pelo fMLP (**Figura 24**). Adicionalmente, o ICPF e o AMB nas concentrações de 10; 25; 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$  mostraram ausência de toxicidade em neutrófilos, determinada através do teste do MTT (**Figura 25**).

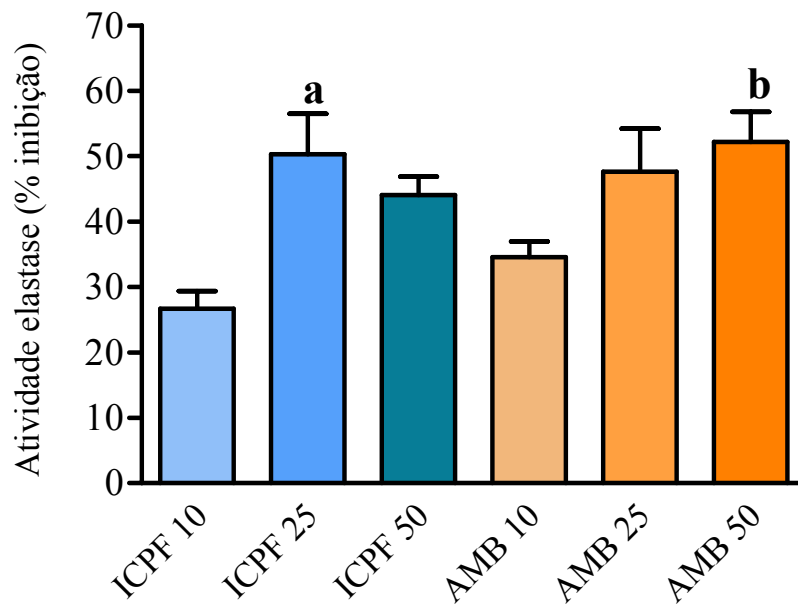
### **4.3. Avaliação das atividades hepatoprotetora e antioxidante do amburosídio A (AMB) isolado de *Amburana cearensis* na hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> em ratos**

Nesse modelo experimental a hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> é iniciada pela ação das enzimas microsossomais hepáticas, citocromo P450, que produzem CCl<sub>3</sub> a partir do CCl<sub>4</sub>. Os produtos da peroxidação lipídica induzida pelo CCl<sub>3</sub> provocam hipofunção da membrana celular além de alterações enzimáticas (MIYAZAWA et al.,1990).

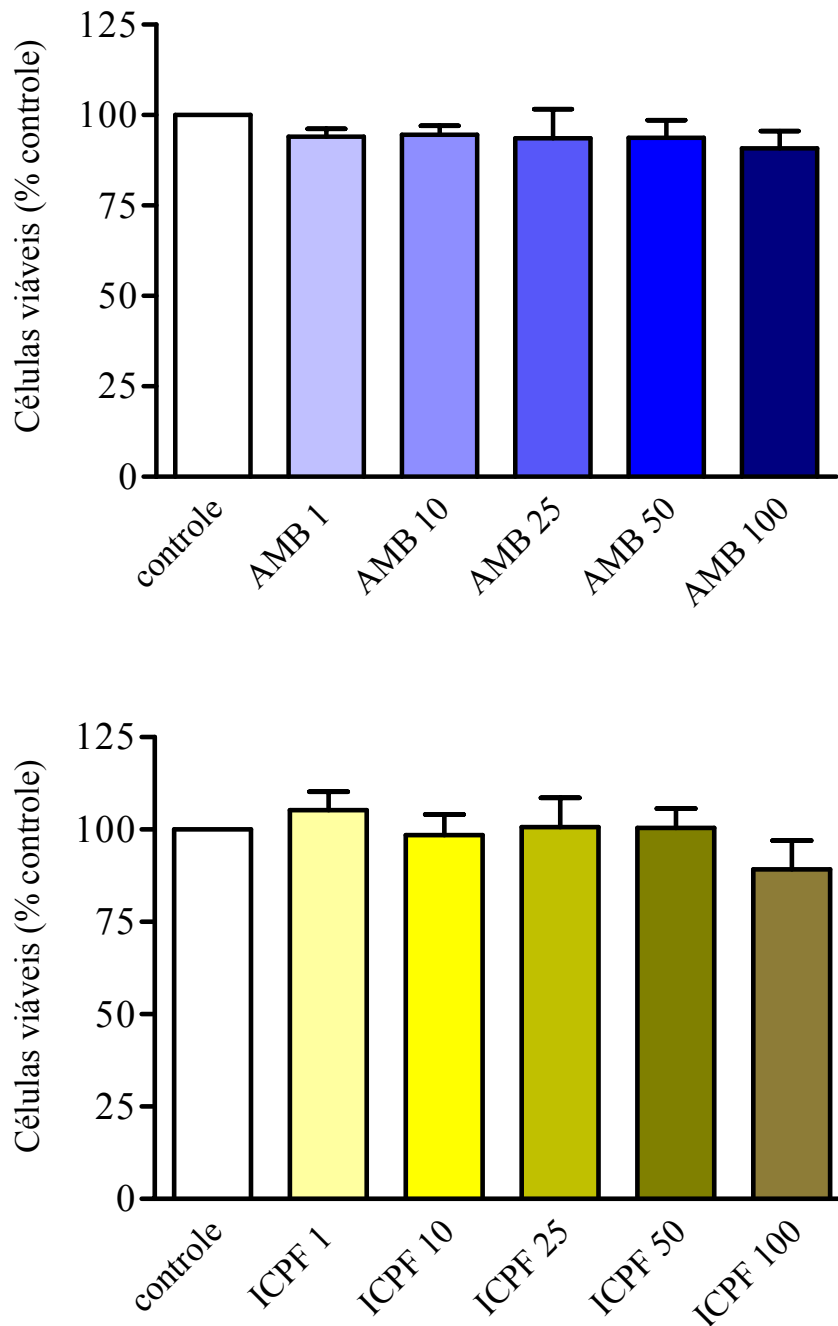
O efeito do AMB sobre a hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> foi investigado através da avaliação da função hepática (ALT/TGP e AST/TGO), da peroxidação lipídica, de sistemas antioxidantes enzimático (catalase) e não enzimático (glutathiona reduzida), além de análise histológica.



**Figura 23.** Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídeo A (AMB) na degranulação de neutrófilos humano estimulados pelo fMLP, determinados pela atividade da mieloperoxidase (MPO). Os resultados obtidos na presença das drogas testes foram comparados em relação ao controle (100 % atividade enzimática). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. As análises foram realizadas pelo menos em quadruplicata e repetidas em três dias diferentes. **a** vs ICPF 25  $\mu$ g/ml, **b** vs AMB 10  $\mu$ g/ml ( $p < 0,05$  – ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 24.** Efeitos do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) na degranulação de neutrófilos humano estimulados pelo fMLP, determinados pela atividade da elastase. Os resultados obtidos na presença das drogas testes foram comparados em relação ao controle (100 % de atividade enzimática). Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. As análises foram realizadas em quadruplicata e repetidas em três dias diferentes. **a** vs ICPF 10  $\mu\text{g/ml}$ , **b** vs AMB 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $p < 0,05$  – ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 25.** Avaliação da citotoxicidade do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) em neutrófilos isolados de sangue humano. O ICPF ou AMB nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Após 30 min de incubação a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M das análises foram realizadas em sextuplicata e repetidas em três dias diferentes. Os resultados obtidos na presença das drogas testes foram comparados em relação ao veículo (controle) (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

- **Determinação do efeito do amburosídeo A (AMB) sobre os níveis séricos das enzimas transaminases (ALT/TGP e AST/TGO)**

A **Tabela 10** mostra o efeito do AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) sobre a elevação dos níveis séricos das enzimas AST/TGO e ALT/TGP induzido pelo CCl<sub>4</sub> em ratos. A administração CCl<sub>4</sub> nos animais pré-tratados apenas com veículo (controle), elevou expressivamente tanto o nível sérico de AST/TGO ( $145,0 \pm 8,11$  U/l), quanto ALT/TGP ( $93,79 \pm 6,64$  U/l) em relação ao grupo salina (AST/TGO:  $57,63 \pm 2,7$  U/l; ALT/TGP:  $32,59 \pm 4,57$  U/l), representado pelos animais que não foram tratados com CCl<sub>4</sub>. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente as atividades das enzimas AST/TGO (28,4 e 44,2 % respectivamente) e ALT/TGP (43,2 e 61,3 % respectivamente) em relação ao grupo controle.

- **Determinação do efeito do amburosídeo A (AMB) sobre a peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica dos hepatócitos tem sido reconhecida como o fator importante na hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub>. Na **Figura 26** pode ser observado o efeito do AMB sobre a formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico -TBARS, parâmetro empregado para mensurar a peroxidação lipídica hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub>. A concentração de TBARS ( $9,96 \pm 0,68$  nmol MDA/mg proteína) foi elevada em 2,6 vezes pelo CCl<sub>4</sub> nos animais pré-tratados com veículo (controle), em relação ao grupo salina ( $3,86 \pm 0,26$  nmol MDA/mg proteína), ou seja animais não submetidos ao tratamento com CCl<sub>4</sub>. Porém, o pré-tratamento dos animais com AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o nível de TBARS, com inibições de 36 e 52 % respectivamente.

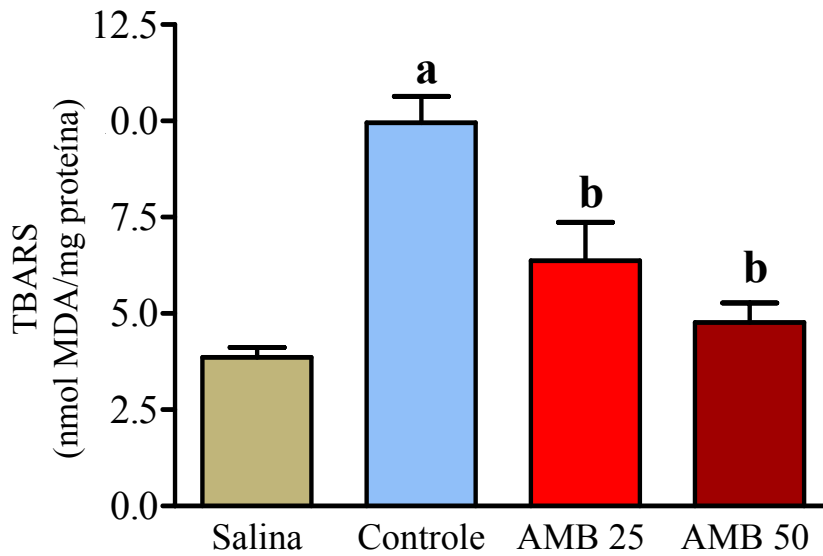
- **Determinação do efeito do amburosídeo A (AMB) sobre o nível de glutathiona reduzida**

A **Figura 27** mostra o efeito do AMB sobre a mudança na concentração de glutathiona reduzida induzida pelo CCl<sub>4</sub> no fígado de ratos. O nível de glutathiona (GSH,  $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína) hepática decresceu significativamente de  $9,58 \pm 0,76$  no grupo salina, para  $5,63 \pm 0,20$  no grupo administrado veículo e CCl<sub>4</sub>, controle. O pré-tratamento dos animais com AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente o nível de glutathiona hepática, sendo quase restabelecida a normalidade ( $8,21 \pm 0,53$  e  $8,72 \pm 0,49$  respectivamente).

**Tabela 10.** Efeito do amburosidio A (AMB) sobre os níveis séricos das enzimas transaminases, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), em ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)

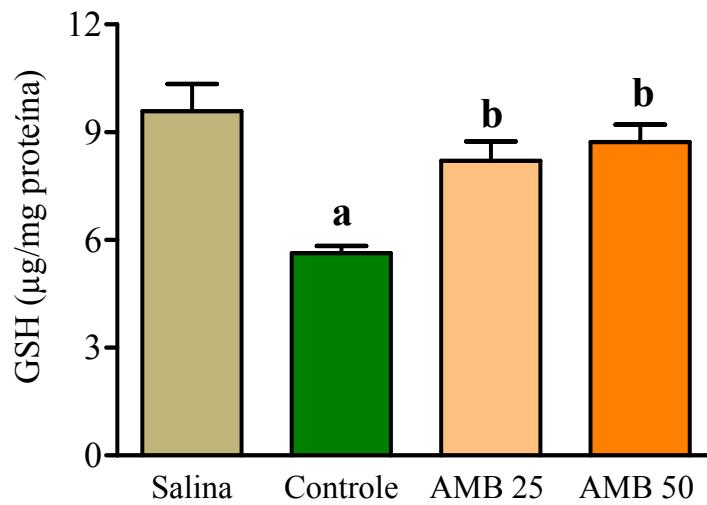
GRUPOS	AST (U/L)	ALT (U/L)
Salina	57,63 ± 2,7	32,59 ± 4,57
Controle	145,0 ± 8,11 <sup>a</sup>	93,79 ± 6,64 <sup>a</sup>
AMB 25 mg/kg, i.p.	103,8 ± 7,9 <sup>b</sup>	53,29 ± 4,96 <sup>b</sup>
AMB 50 mg/kg, i.p.	80,9 ± 6,73 <sup>b</sup>	36,28 ± 4,88 <sup>b</sup>

Os animais do grupo salina receberam apenas salina, i.p. e óleo de oliva, subcutânea (s.c.) enquanto os demais grupos foram pré-tratados com veículo (controle) ou AMB 30 min antes e 24 h após a administração de CCl<sub>4</sub> a 50% em óleo de oliva, s.c. A atividade enzimática foi determinada 48 h após a injeção de CCl<sub>4</sub>. Os resultados estão expressos como média ± E.P.M. de 7 animais por grupo, **a** vs controle, **b** vs CCl<sub>4</sub> (p<0,05, ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 26.** Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico-TBARS em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Os animais foram tratados com AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) ou veículo (controle) 30 min antes e 24 h após a administração do  $\text{CCl}_4$  a 50% em óleo de oliva. O grupo salina foi tratado apenas com salina, i.p. e óleo de oliva, s.c. O nível de TBARS, expresso pela concentração de malonildialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica, foi determinado 48 h após a injeção de  $\text{CCl}_4$ . Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo. **a** vs salina, **b** vs controle ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).





**Figura 27.** Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a redução no nível de glutatona reduzida (GSH) induzida pelo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em fígado de ratos. Os animais foram tratados com veículo (controle.) ou AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) 30 min antes e 24 h após a administração do  $\text{CCl}_4$  a 50% em óleo de oliva. O grupo salina foi tratado apenas com salina, i.p. e óleo de oliva, s.c. O nível de GSH foi determinado 48 h após a injeção de  $\text{CCl}_4$ . Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo. **a** vs salina, **b** vs controle (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).

- **Determinação do efeito do amburosídeo A (AMB) sobre a atividade da Catalase**

A **Figura 28** mostra que a atividade da catalase (mmol/min/mg proteína) no fígado de animais do grupo salina ( $79,57 \pm 9,68$ ) foi significativamente aumentada em relação ao grupo administrado veículo e  $\text{CCl}_4$ , ou seja controle ( $155,5 \pm 15,39$ ). Entretanto, o pré-tratamento dos animais com AMB inibiu de maneira dose dependente a atividade da catalase. Na maior dose o AMB (50 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente a atividade da catalase ( $74,98 \pm 10,24$ ), correspondendo a uma inibição de 52 %, enquanto na menor dose (25 mg/kg, i.p.), a atividade da catalase foi reduzida em apenas 12 %.

- **Análise histopatológica do fígado de ratos pré-tratados com amburosídeo A (AMB) e tratados com  $\text{CCl}_4$**

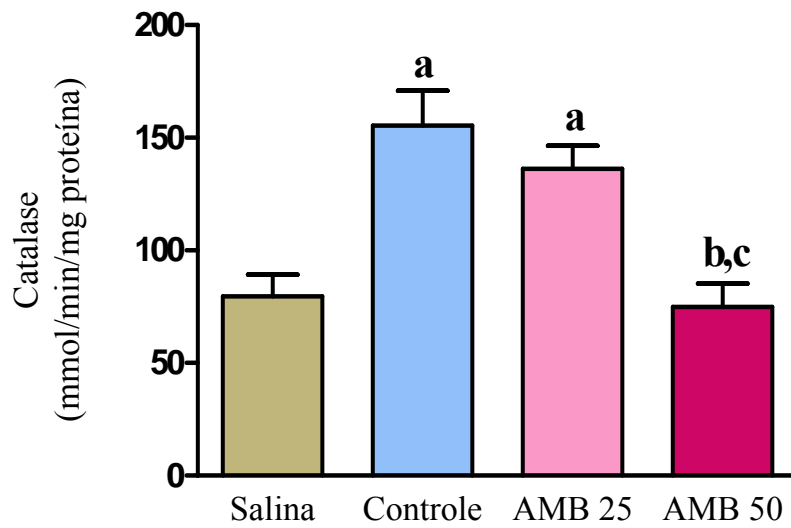
O tratamento dos animais com o  $\text{CCl}_4$  causou mudanças histológicas importantes no fígado dos ratos, que apresentaram necrose centrolobular intensa além do infiltrado de células inflamatórias. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com AMB nas doses de 25 e 50 mg/kg, i.p., reduziu de maneira dose-dependente as alterações histológicas causadas pela administração do  $\text{CCl}_4$  (**Figura 29**).

#### **4.4. Avaliação do efeito do ICPF e do AMB sobre a contratilidade da musculatura lisa traqueal de cobaia**

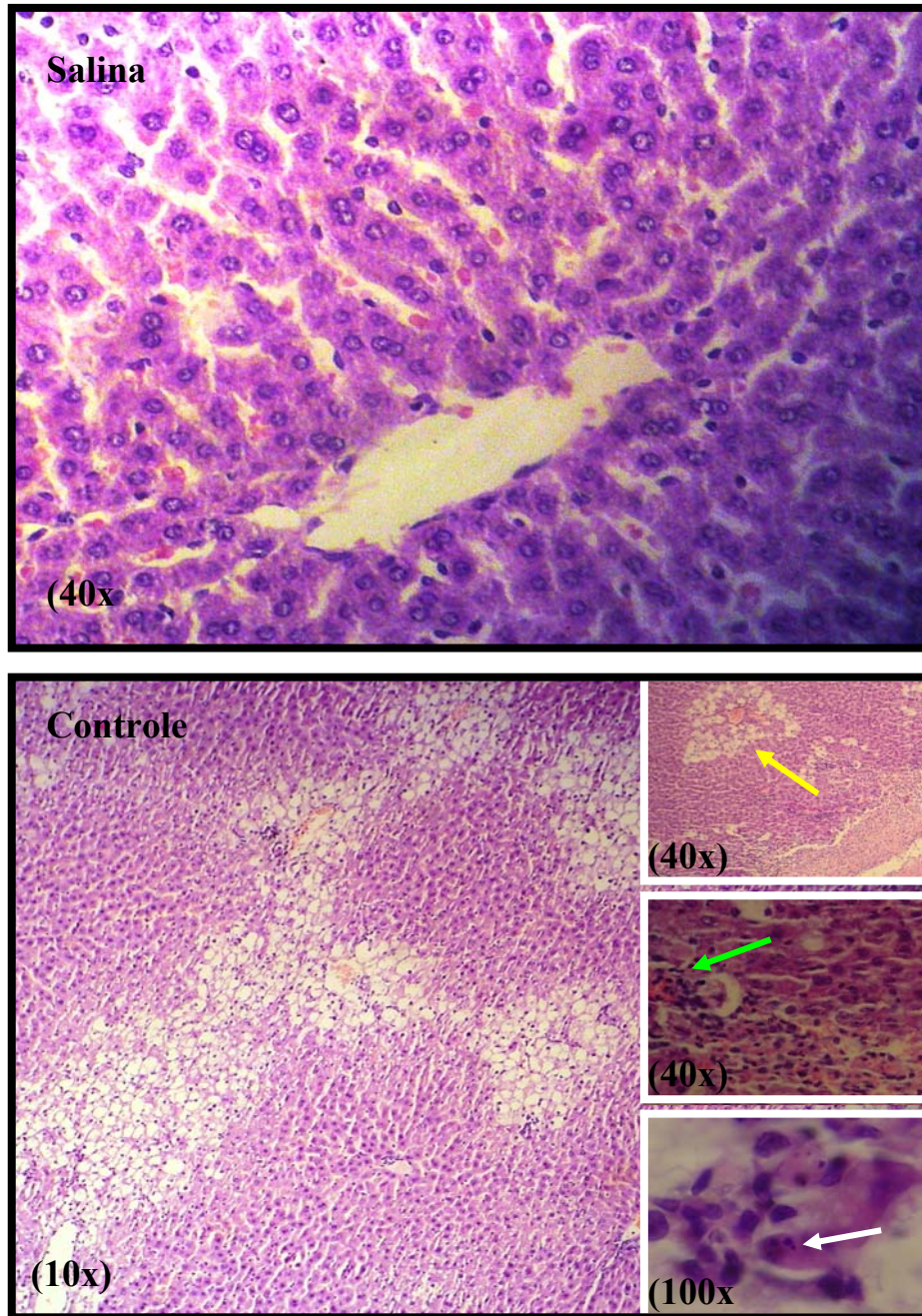
O ICPF (10 – 1000  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CE}_{50}$ : 107,3 [80,8 – 142,4]  $\mu\text{M}$ ) foi capaz de relaxar o músculo liso traqueal de cobaia pré-contraído pelo carbacol (CCh) de maneira concentração-dependente, apresentando-se inclusive mais potente em relação à teofilina (3 – 3000  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CE}_{50}$ : 552,8 [385,8 – 792,1]  $\mu\text{M}$ ), droga padrão (**Figura 30, Tabela 11**).

Em parte dos experimentos o ICPF alterou o tônus basal (Efeito Máximo ( $E_{\text{max}}$ ):  $6,15 \pm 2,92$  %), enquanto nenhum efeito foi observado pela adição do veículo em concentrações crescentes (Tween 80 de 0,0024 – 0,24% em água). Por outro lado, no músculo pré-contraído pelo CCh ou KCl o veículo causou um relaxamento máximo de  $8,38 \pm 1,23$  ou  $7,39 \pm 1,07$  % respectivamente.

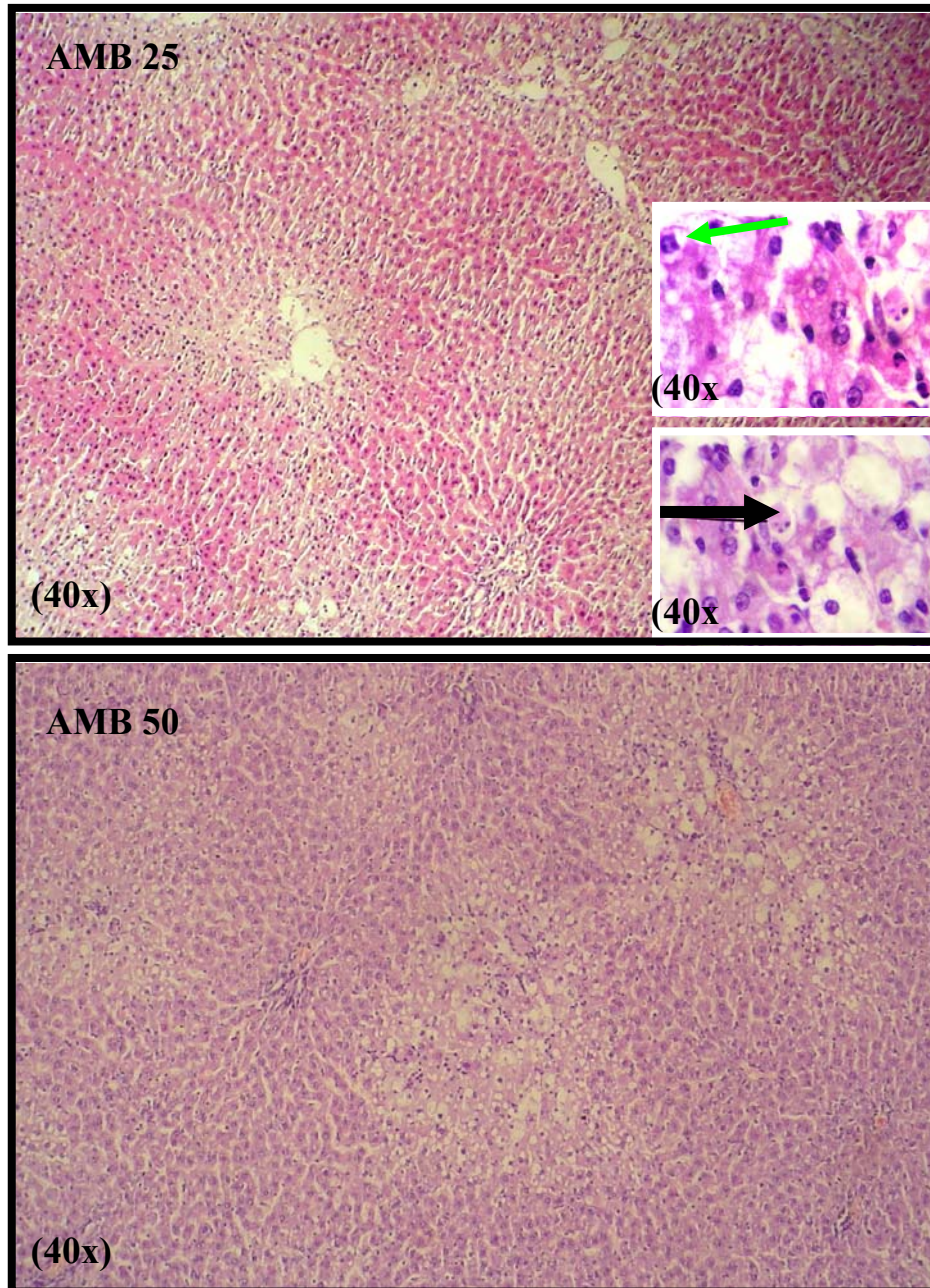
O ICPF apresentou um efeito relaxante mais potente no músculo pré-contraído pelo KCl em relação a contração induzida pelo CCh, enquanto o AMB (10 – 3000  $\mu\text{M}$ ) que também relaxou de maneira concentração-dependente o músculo liso traqueal pré-contraído



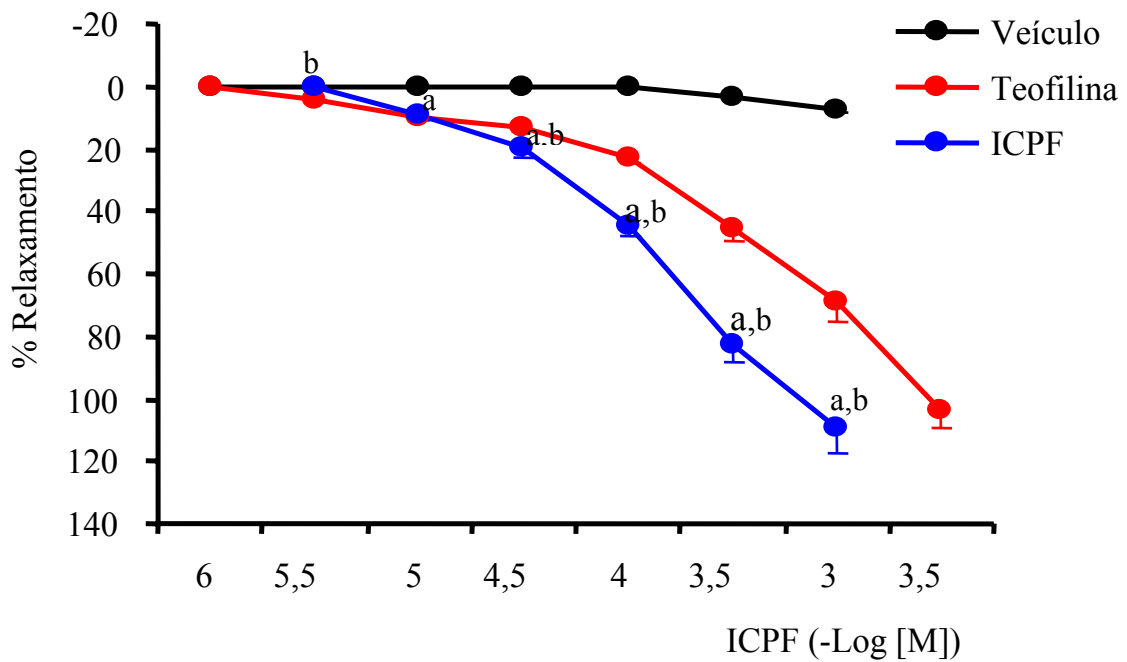
**Figura 28.** Efeito do amburosídio A (AMB) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ). Os animais foram tratados com veículo (controle) ou AMB (25 e 50 mg/kg, i.p.) 30 min antes e 24 h após a administração do  $\text{CCl}_4$  a 50% em óleo de oliva (s.c.). O grupo salina foi tratado apenas com salina, i.p. e óleo de oliva. A atividade da catalase foi determinada 48 h após a injeção de  $\text{CCl}_4$ . Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. de 7 animais por grupo. **a** vs salina, **b** vs controle, **c** vs AMB 25 (ANOVA e teste de Tukey, como teste *post hoc*).



**Figura 29a.** Fotomicrografia ilustrando a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em ratos. No grupo salina (salina, i.p. + óleo de oliva, s.c.) observa-se o tecido hepático com aparência normal, diferindo do grupo controle (veículo +  $\text{CCl}_4$  50% em óleo de oliva, s.c.) que apresenta esteatose acentuada melhor observada em maior aumento (seta amarela), necrose e infiltrado inflamatório com agregados de granulócitos (seta verde), além de células apoptóticas (seta branca).



**Figura 29b.** Fotomicrografia ilustrando o efeito do ambrosídio A (AMB) sobre a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em ratos. O grupo tratado com AMB, 25 mg/kg, i.p., apresentou esteatose moderada, infiltrado inflamatório moderado (granulócitos (seta verde) e algumas células apoptóticas (seta preta)). Enquanto os animais tratados com o AMB, 50 mg/kg, i.p., apresentaram redução considerada da esteatose e um infiltrado inflamatório discreto.



**Figura 30.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF), da teofilina ou do veículo (solução aquosa de Tween 80: 0,0024 – 0,24 %) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. **a** e **b** ICPF vs veículo ou teofilina respectivamente por concentração (\*  $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.

pelo CCh (CE50: 93,9 [46,8 – 188,3]  $\mu\text{M}$ ) ou KCl (CE50: 342,3 [320,2 – 365,9]  $\mu\text{M}$ ) se mostrou mais potente no músculo pré-contraído pelo CCh. À semelhança do ICPF o AMB também se mostrou mais potente que a teofilina no músculo pré-contraído pelo CCh (**Tabela 11**).

A remoção do epitélio traqueal favoreceu o efeito relaxante do ICPF (CE50 – com epitélio: 77,4 [54,8 – 109,2]  $\mu\text{M}$ ; sem epitélio: 15,0 [11,3 – 20,1]  $\mu\text{M}$ ) em músculo pré-contraído pelo CCh, com aumento significativo do efeito (ICPF:  $10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) em relação a preparação com epitélio (**Figura 31**). Por outro lado, a ausência do epitélio não modificou o efeito relaxante do AMB em músculo pré-contraído pelo CCh (**Figura 32**).

Em geral o ICPF mostrou respostas melhores em relação ao AMB, assim passamos a investigar o possível mecanismo de ação relaxante do ICPF. Para investigar a possível participação da via óxido nítrico/GMPc no efeito relaxante do ICPF, foram realizados experimentos na ausência e na presença de L-NAME (antagonista competitivo da enzima óxido nítrico sintase) ou ODQ (inibidor seletivo da enzima guanilato ciclase). Em traquéia de cobaia com epitélio, o L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ), reduziu significativamente o efeito relaxante do ICPF com inibições de 41 a 59 % da resposta (**Figura 33**). Resultados semelhantes foram observados nas preparações em traquéia sem epitélio, onde o ICPF na presença do L-NAME apresentou um efeito máximo de  $96,05 \pm 5,41$  %, enquanto na ausência do L-NAME o efeito máximo foi de  $136,5 \pm 7,9$  (**Figura 34**). O ODQ (3 e 33  $\mu\text{M}$ ) em traquéia com epitélio preveniu significativamente o efeito relaxante do ICPF, que nas concentrações investigadas teve seu efeito reduzido em até 47 e 63 % respectivamente (**Figura 35**).

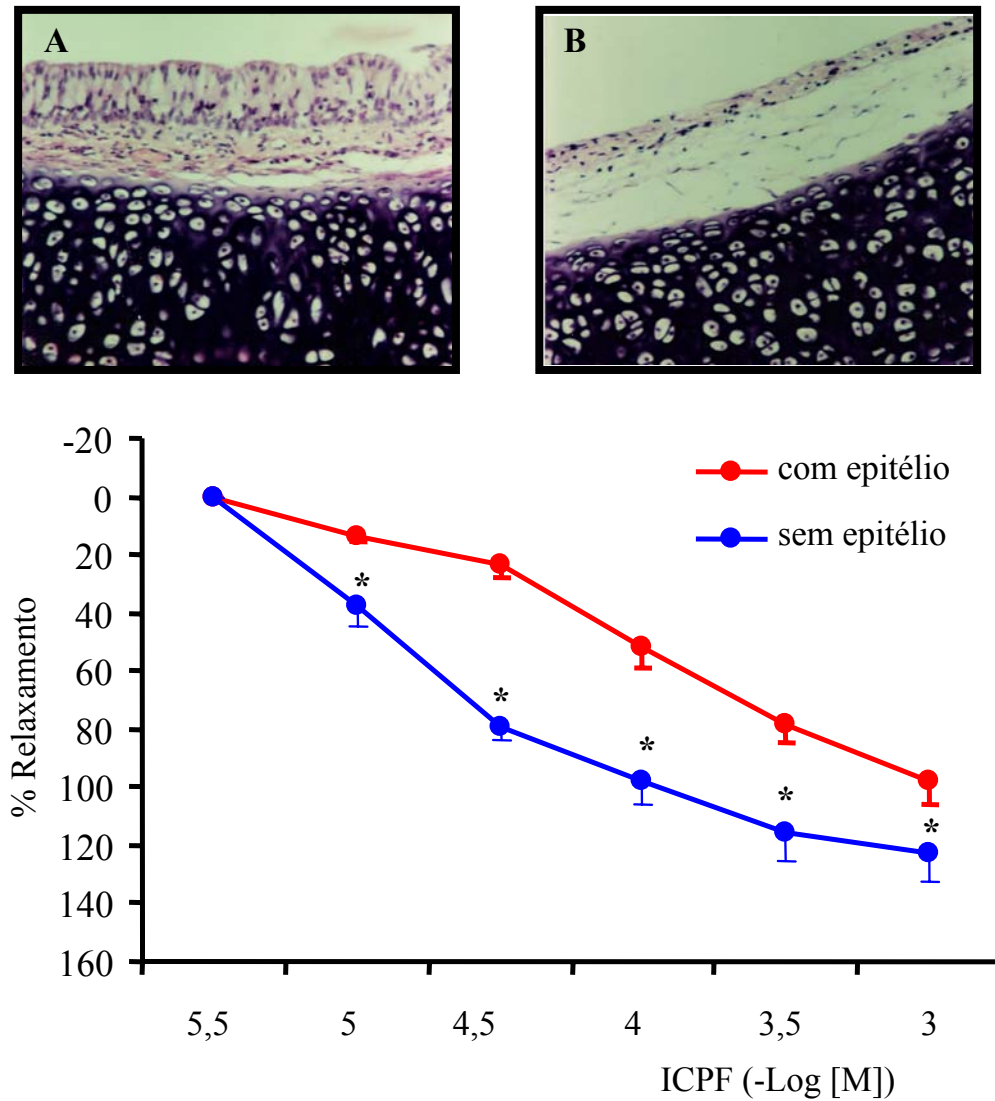
O papel dos canais de potássio no efeito relaxante do ICPF foi também investigado com a utilização de vários bloqueadores de canais de potássio. Para tanto, inicialmente foi verificado que o efeito relaxante do ICPF ( $3 \times 10^{-6}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) observado no músculo pré-contraído por KCl 40 mM foi significativamente reduzido em relação às preparações pré-contraídas por KCl 120 mM (concentração capaz de induzir despolarização máxima da membrana celular), com inibições de 35 a 100 %. Além disso, no músculo pré-contraído pelo KCl 120 mM a curva concentração-resposta do ICPF foi deslocada para a direita. Na traquéia pré-contraída pelo KCl (40 mM) a glibenclamida (33  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de canais de potássio sensíveis ao ATP, foi capaz de reduzir em 35 % o efeito máximo do ICPF, enquanto na traquéia pré-contraída por KCl 120 mM a glibenclamida não modificou a resposta muscular à presença do ICPF (**Figura 36**).

**Tabela 11.** CE50 obtida da curva concentração-resposta do efeito relaxante ICPF ou AMB em traquéia de cobaia pré-contraída pelo carbacol (CCh) ou potássio (KCl).

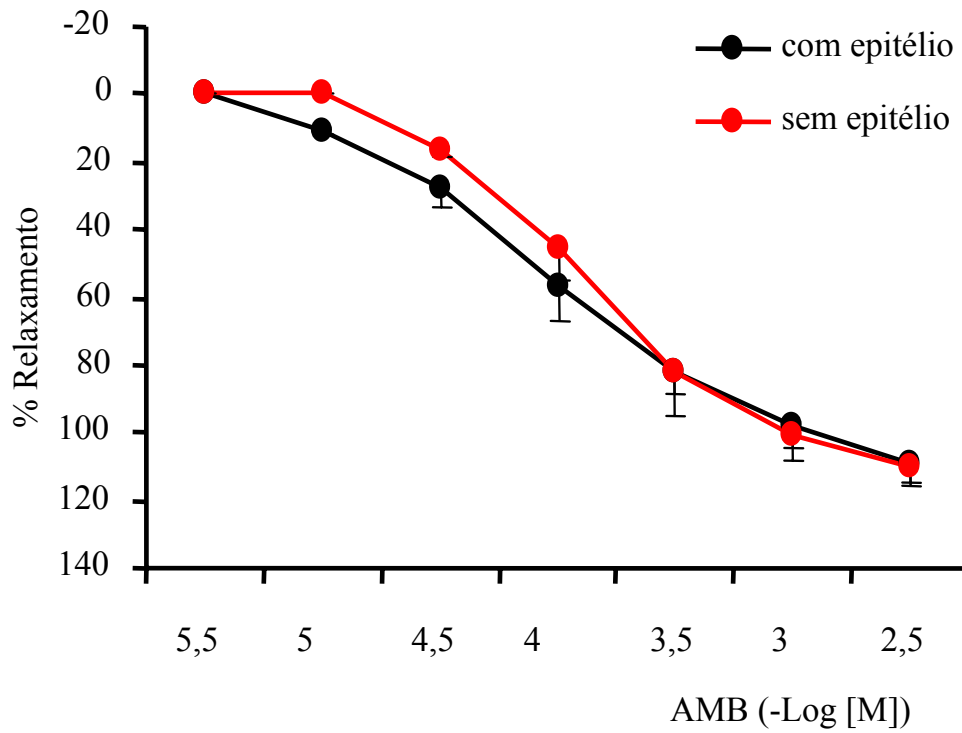
GRUPOS	CE50 ( $\mu\text{M}$ )	
	CCh	KCl
AMB	93,9 <sup>a,c</sup> (46,8 – 188,3)	342,3 (320,2 – 365,9)
ICPF	107,3 <sup>a,b</sup> (80,8 – 142,4)	15,5 (11,3 – 21,0)
Teofilina	552,8 (385,8 – 792,1)	ND

Os valores representam a média geométrica com intervalo de confiança de 95%, das concentrações de isocampferídio (ICPF) ou amburosídio A (AMB) que produziram 50% da resposta máxima, em músculo pré-contraído pelo CCh (30 ou 100  $\mu\text{M}$ ) ou KCl (40 mM). Os resultados foram obtidos de 5 – 6 experimentos. **a** vs teofilina, **b** vs ICPF-KCl e **c** vs AMB-KCl ( $P < 0,05$ , teste “t” Student). ND: não determinado.

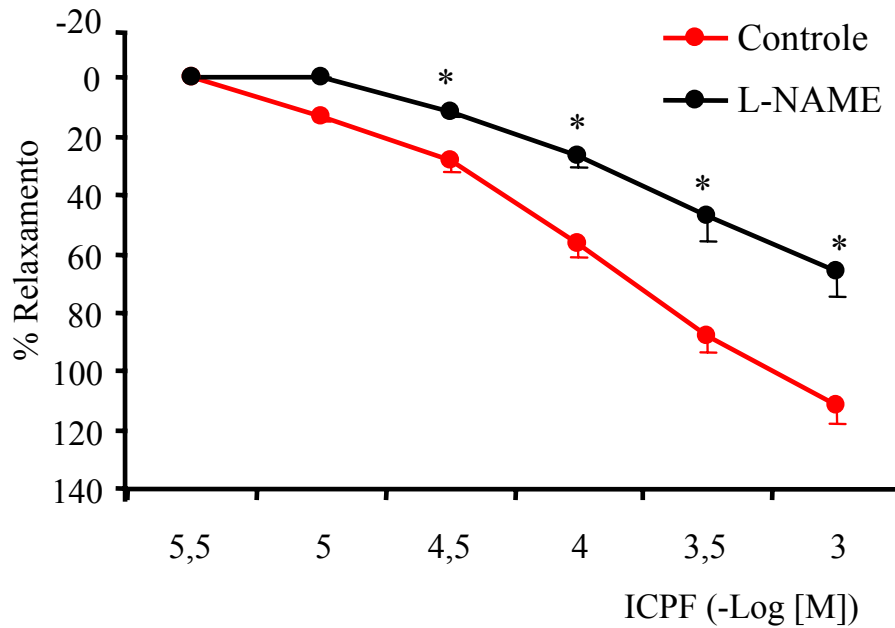




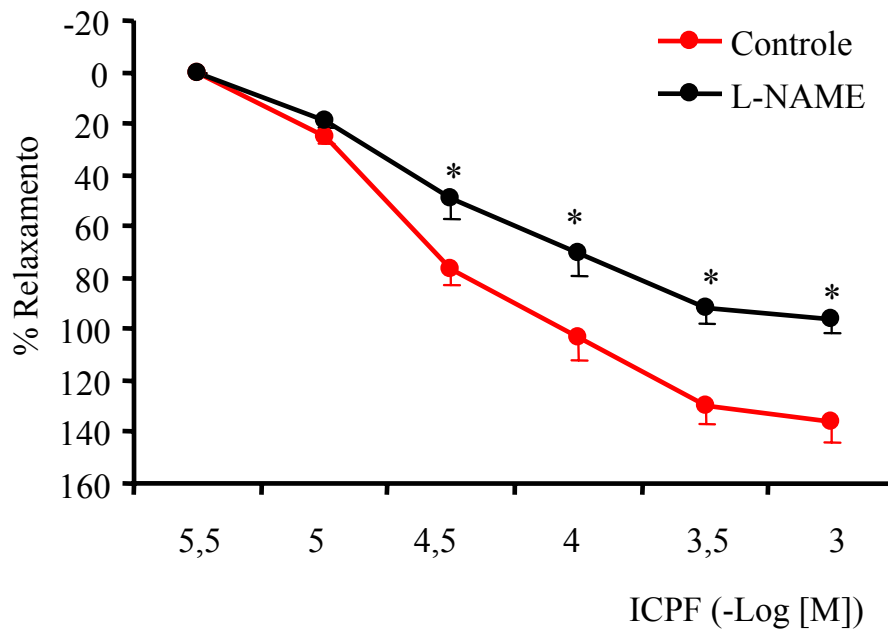
**Figura 31.** Fotomicrografia ilustrando a traquéia de cobaia com (A) e sem epitélio (B). Curva concentração-resposta relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia com ou sem epitélio pré-contraída por carbacol (CCh). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 - 8 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Com epitélio vs sem epitélio por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student).



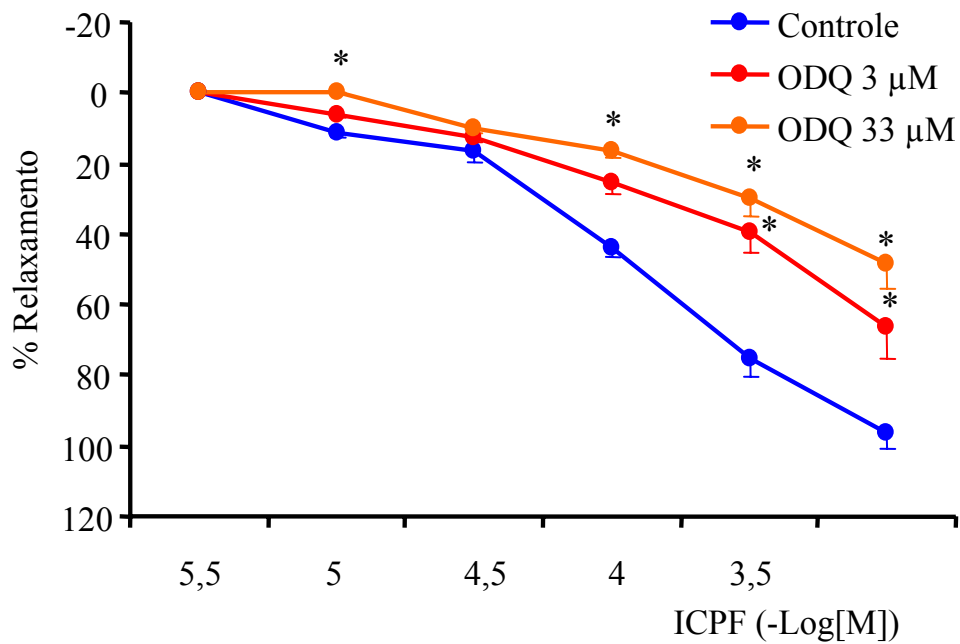
**Figura 32.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do amburosidio A (AMB) em traquéia com ou sem epitélio pré-contraída por carbacol (CCh). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 5 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. \* $p < 0,05$  (teste “t” de Student).



**Figura 33.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocamferídio (ICPF) em traquéia com epitélio isolada de cobaia e pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do L-NAME (100  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 - 8 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs L-NAME por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste "t" Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.



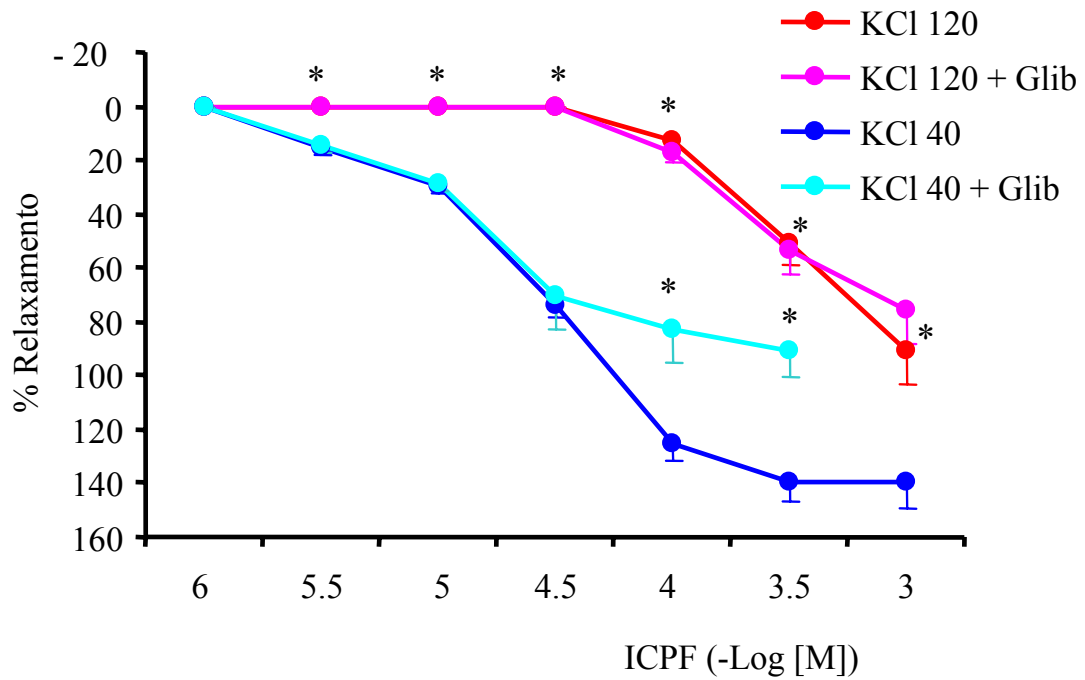
**Figura 34.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia sem epitélio e pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do L-NAME (100  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 - 8 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs L-NAME por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.



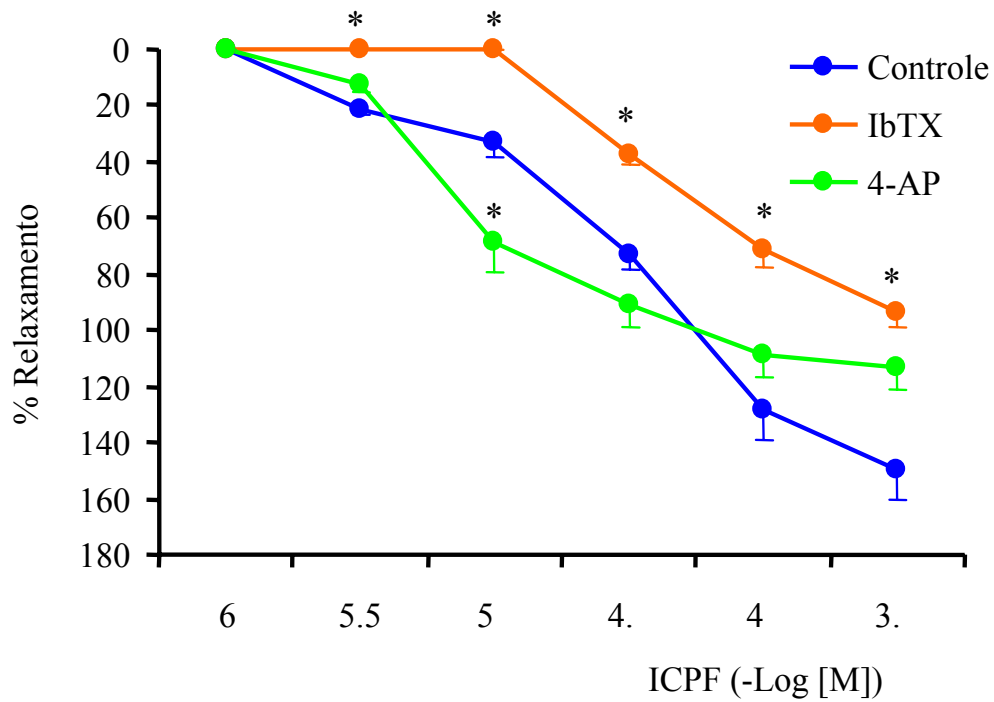
**Figura 35.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) na traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do ODQ. Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs ODQ (3 e 33  $\mu$ M) por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.

Dando continuidade a avaliação da participação dos canais de potássio no efeito relaxante do ICPF, foi verificado que a iberiotoxina (IbTX; 0,1  $\mu$ M), bloqueador dos canais de potássio sensíveis ao cálcio, inibiu de 38 a 100 % o relaxamento induzido pelo ICPF, além de ter deslocado para a direita a curva concentração-resposta do efeito relaxante do ICPF. Por outro lado, a 4-AP (100  $\mu$ M), bloqueador dos canais de potássio voltagem dependente, não interferiu significativamente no efeito relaxante do ICPF (**Figura 37**).

A incubação da traquéia com propranolol (1  $\mu$ M), antagonista competitivo  $\beta$ -adrenérgico, produziu uma inibição de 31 a 51% do efeito relaxante do ICPF (**Figura 38**), enquanto a capsaicina (3  $\mu$ M), um agente excitatório e dessensibilizante dos neurônios aferentes primários, inibiu em até 61 % o efeito relaxante do ICPF (**Figura 39**).

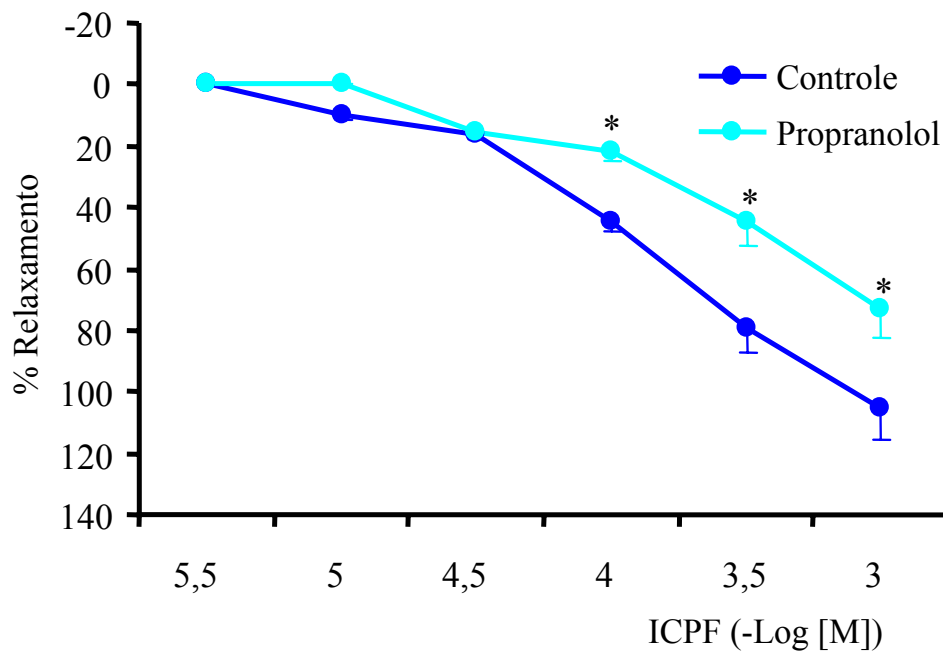


**Figura 36.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocamferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por KCl (40 ou 120 mM) na ausência ou na presença da glibenclamida (Glib, 33  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 5 - 8 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. KCl 40 mM vs KCl 120 mM e KCl 40 mM vs KCl 40 mM + Glib por concentração (\*  $p < 0,05$ ; teste "t" Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.

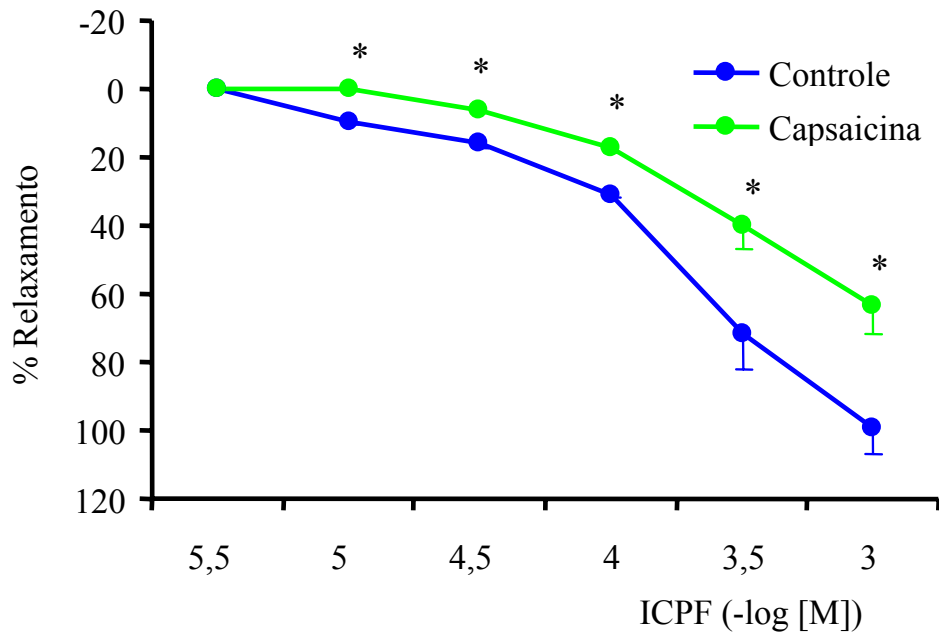


**Figura 37.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) na traquéia isolada de cobaia pré-contraída por KCl (40 mM) em ausência (controle) ou na presença da iberiotoxina (IbTX, 0,1  $\mu$ M) ou 4-aminopiridina (4-AP, 100  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 5 - 8 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs IbTX ou 4-AP por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.





**Figura 38.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença do propranolol (1  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs propranolol por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.



**Figura 39.** Curva concentração-resposta do efeito relaxante do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobaia pré-contraída por carbacol (CCh) na ausência (controle) ou na presença da capsaicina (3  $\mu$ M). Cada ponto representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 experimentos. As barras verticais representam E.P.M. Controle vs capsaicina por concentração (\* $p < 0,05$ ; teste “t” Student). Em alguns pontos da figura o E.P.M. não é visualizado por estar muito próximo aos símbolos.

# DISCUSSÃO

---



## 5. DISCUSSÃO

*Amburana cearensis* é uma árvore utilizada tradicionalmente na região nordeste do Brasil no tratamento da tosse, bronquite e asma. Suas cascas do caule têm sido empregadas na produção de chás ou de xaropes, estes produzidos por programas governamentais de fitoterapia ou por indústrias farmacêuticas nacionais. Em estudos anteriores (LEAL et al., 1997; 2000; 2003) mostramos as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e relaxante muscular do extrato hidroalcoólico, da cumarina e da fração flavonóide obtidos de *A.cearensis*. No presente estudo foram investigadas as atividades antiinflamatória, antioxidante e relaxante muscular de dois compostos fenólicos, isocampferídio (ICPF, 3-metilflavonol) e amburosídio A (AMB, glucosídeo fenólico), isolados da cascas do caule da planta.

Numa avaliação preliminar, o ICPF e o AMB administrados sistemicamente apresentaram uma baixa toxicidade aguda. A possível citotoxicidade desses compostos foi avaliada em cultura primária de células hepáticas através do teste do MTT, onde a viabilidade celular foi mensurada pela atividade das desidrogenases mitocondriais sobre o sal de tetrazolium (MTT) (MOSMANN, 1983). O AMB não interferiu na viabilidade das células hepáticas, enquanto o ICPF reduziu significativamente a viabilidade celular apenas na concentração de 100 µg/ml. A ausência de citotoxicidade do AMB e a hepatotoxicidade do ICPF, foi corroborada por estudos anteriores (BANSKOTA et al., 2000a; COSTA-LOTUFO et al., 2003) que determinaram a citotoxicidade do ICPF para algumas linhagens de células tumorais, bem como em larvas de ouriços, *Lytechinus variegatus*. Por outro lado, Banskota et al. (2000b) mostraram que o ICPF possui ação hepatoprotetora *in vitro*.

Recentemente (LEAL et al., 2005) demonstramos que o AMB não foi citotóxico também em células mesencefálicas de ratos, e possui uma ação neuroprotetora observada por sua ação antioxidante no modelo de neurotoxicidade induzida pela 6-hidroxi-dopamina.

A atividade antiinflamatória de compostos fenólicos incluindo flavonóides e glicosídeos fenólicos tem sido demonstrada amplamente (MANTHEY, 2000; MIDLETON et al., 2000), porém esse é o primeiro estudo que caracteriza a bioatividade *in vivo* do AMB, além das atividades farmacológicas inéditas do ICPF.

O processo inflamatório é caracterizado pela produção de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos, histamina e bradicinina, além da liberação pelos tecidos e células de fatores quimiotáticos (TOMLINSON et al., 1994). O modelo de inflamação induzido por carragenina (edema de pata e peritonite) é comumente utilizado para avaliar drogas antiinflamatórias. As características bioquímicas e celulares do

edema de pata induzido por carragenina foram bem descritas no passado e têm sido constantemente implementadas com novas descobertas (DI ROSA et al., 1971 a, b; 1972; GARCIA LEME et al., 1973; POSADAS et al., 2004). O processo envolve uma ação sequencial de vários mediadores, ocorrendo inicialmente (edema, 0-1 h) a liberação de histamina, serotonina e bradicinina, seguida (edema, 1-6 h) principalmente pelo aumento nos níveis de prostaglandinas (PGs). A liberação de PGs coincide com a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, que amplificam a resposta inflamatória com a produção dentre outros mediadores, de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases tais como a mieloperoxidase (MPO), enzima claramente correlacionada com a severidade do processo (FANTONE & WARD, 1982; NANTEL et al., 1999; POSADAS et al., 2004). Outro mediador importante é o óxido nítrico (ON), produzido em condições fisiopatológicas por três isoformas de ON sintase: endotelial, neuronal e induzível (MONCADA & HIGGS, 1991).

Estudo mais recente (GUAY et al., 2004) caracterizou o edema da carragenina, numa fase inicial (1-6 h) e tardia (12-24 h). A primeira fase foi associada com o aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> e tromboxano B<sub>2</sub> e com a expressão acentuada da PGE<sub>2</sub> sintase precedida pela expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). Porém, COX-2 e PGE<sub>2</sub> sintase permanecem elevadas na fase tardia.

O ICPF e o AMB à semelhança da indometacina, inibidor inespecífico da enzima ciclooxigenase, após administração sistêmica, reduziram significativamente o edema de pata induzido pela carragenina. Esse resultado sugere o potencial antiinflamatório dos referidos compostos, fato este corroborado pela capacidade do ICPF e do AMB de bloquearem parcialmente a infiltração de leucócitos para o foco inflamatório, observada pela análise morfométrica da pata dos animais.

Para investigarmos a possível participação de alguns mediadores inflamatórios, na atividade antiinflamatória do ICPF e do AMB foi avaliado o efeito da administração sistêmica desses compostos nos edemas de pata induzidos pela PGE<sub>2</sub>, dextrano, histamina, serotonina ou bradicinina.

O ICPF e o AMB inibiram significativamente o edema de pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. As prostaglandinas, metabólitos do ácido araquidônico pela ação das isoenzimas ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), têm um papel regulatório chave na imunidade e na inflamação (GOETZL et al., 1995; PHIPPS et al., 1991). Uma das mais conhecidas e bem estudadas prostaglandina é a PGE<sub>2</sub> produzida por muitos tipos celulares (ex.: fibroblastos e macrófagos), que exerce suas ações ligando-se ao seu receptor classificado em EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>, acoplados à proteína G (BREYER et al., 2001). A PGE<sub>2</sub> interage com os linfócitos T,

estimulando via AMPc a produção de interleucinas (IL-4, 5 e 10) pelos linfócitos T helper 2, ou inibindo a produção de IL-2 e interferon- $\gamma$  como ocorre nas linfócitos T helper 1 (HILKENS et al., 1996). Nos linfócitos B a PGE<sub>2</sub> estimula a produção de imunoglobulinas, como IgG e IgE. Finalmente, a PGE<sub>2</sub> de uma maneira autócrina regula a sua própria expressão via COX-2 (HARRIS et al., 2002). Assim, os resultados obtidos sugerem que os efeitos antiedematogênicos do ICPF e do AMB estão possivelmente relacionados a um bloqueio da síntese ou até mesmo da ação de prostaglandinas, como a PGE<sub>2</sub>.

O dextrano induz o edema por mecanismos distintos em relação à carragenina, neste caso, o aumento da permeabilidade vascular dá-se devido a desgranulação de mastócitos e, conseqüente liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina. Além disso, o exsudato produzido apresenta poucas proteínas e neutrófilos (LO et al., 1982). O tratamento dos animais com ICPF ou AMB inibiu significativamente o edema de pata e o aumento da permeabilidade vascular induzidos pelo dextrano, bem como os edemas induzidos pela histamina ou serotonina. Por outro lado, o ICPF e o AMB não interferiram no edema de pata induzido por bradicinina. Assim, os resultados sugerem que a ação antiinflamatória do ICPF e do AMB pode estar relacionada a um possível bloqueio da liberação e/ou até mesmo da ação da histamina e serotonina. Essa hipótese é suportada pelo fato de que muitos flavonóides, incluindo quercetina e campferol, flavonóis que possuem uma estreita correlação estrutural com o ICPF (Figura 3), inibem a liberação de histamina por mastócitos de ratos (GROSSMAN, 1988; MIDDLETON et al., 2000).

A migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) tem um papel importante na resposta inflamatória (ZAK-NEJMARK et al., 1996), constituindo a primeira linha de defesa contra a invasão de bactérias. Nestas condições, os neutrófilos migram para os tecidos infectados e inflamados estimulados por um gradiente de concentração de moléculas quimiotáticas, tais como citocinas, fator de complemento C5a e produtos bacterianos, como o fMLP e lipopolissacarídeo (WITKO-SARSAT et al., 2000; COHEN, 2002).

Usualmente os PMNs são considerados como uma população de leucócitos envolvida na resposta inflamatória aguda, sendo citados normalmente por sua atividade fagocitária e pela produção e liberação de enzimas proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Entretanto, os neutrófilos são biosinteticamente ativos e podem produzir também uma variedade de mediadores inflamatórios, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, proteína inflamatória macrofágica (MIP)-1 $\alpha$  e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (DUBRAVCC et al., 1990; WCI et al., 1993; BAZZONI et al., 1991; CASSATELLA et al., 1997; LAPINCT et al., 2000; TAICHMAN et al., 1997; KASAMA et

al., 2000; 2005). Assim, os PMNs ocupam um posição importante na resposta inflamatória, onde eles regulam e orquestram não apenas a resposta inflamatória aguda, mas também a inflamação crônica, além da regulação da resposta imune (KASAMA et al., 2005).

Nossos resultados mostraram que a inflamação aguda induzida pela carragenina ou pelo fMLP no peritônio de camundongos, levou a um infiltrado celular expressivo, predominantemente neutrófilos, que foi reduzido significativamente pelo tratamento sistêmico dos animais com ICPF ou AMB. Esses dados confirmam estudos anteriores (LEAL et al., 2003) nos quais demonstramos a habilidade do extrato e da fração flavonóide (possui como componente majoritário o ICPF) de *A. cearensis* em reduzir o acúmulo de células no peritônio de ratos.

Tem sido demonstrado que enquanto a carragenina induz a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, de maneira indireta dependendo da liberação de fatores quimiotáticos por células residentes (SOUZA et al., 1988), o fMLP induz a migração de leucócitos de maneira direta devido a sua natureza quimiotática. Além disso, estudos (TOMLINSON et al., 1994; HATANAKA et al., 1999) mostram que a injeção de carragenina no peritônio de ratos induz a expressão da ON sintase (isoforma induzida) e COX-2, levando assim à liberação de uma grande quantidade de ON e PGs.

O fMLP, produto do metabolismo bacteriano, é um dos mais importantes peptídios quimiotáticos na resposta imune (MURPHY, 1994). A ligação do fMLP ao seu receptor, receptor peptídio formil (FPR) e FPR-like 1 (FPRL1) (BOULAY et al., 1990; SU et al., 1999), causa a ativação da fosfolipase C (PLC) e a produção de dois segundos mensageiros, trifosfato de inositol e diacilglicerol, que desencadeiam a liberação de cálcio intracelular e exocitose de enzimas (Nick et al., 1997). O fMLP pode ativar também as vias p38 e p42/44 MAPK (*mitogen activated protein kinase*). A ativação da primeira via leva à ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> e por conseqüência a produção de eicosanóides, enquanto na segunda via são desencadeados os processos de adesão, quimiotaxia e desgranulação (NICK et al., 1997; PARTRICK et al., 2000; BURG & PILLINGER, 2001).

Portanto, o fMLP é um ativador potente de neutrófilos e macrófagos, e uma das respostas celulares mais importantes como resultado dessa ativação, é a secreção de enzimas lisossomais, incluindo mieloperoxidase e elastase (SPISANI et al., 1996a, b; SEGAL, 2005). No presente estudo o ICPF e o AMB inibiram parcialmente a desgranulação de neutrófilos humanos estimulados pelo fMLP, determinada pelas atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase.

A MPO é uma enzima multifuncional envolvida na defesa do hospedeiro e na lesão tecidual relacionada à inflamação. Essa enzima além de produzir oxidantes, contribui também na regulação da resposta à invasão de microorganismos (ARNHOLD et al., 2004).

Estudo realizado por Lau et al. (2005) permitiu caracterizar as propriedades da MPO na inflamação. Primeiramente, a MPO não modula apenas a cascata de sinalização intercelular, mas também modifica a via de sinalização intracelular nos PMNs. Em segundo lugar as mudanças proporcionadas pela ativação PMNs independe da ação catalítica da enzima, mas depende de suas propriedades biofísicas como ligante das integrinas CD11b/CD18. Conseqüentemente, a ligação da MPO às integrinas leva a um aumento na fosforilação da tirosina, ativação MAPK (*mitogen antigen activate kinase*) quinase, translocação do NFκB e a modificações dos eventos que são sensíveis a reação redox (HOMMES et al., 2003; GRIENGLING et al., 2000). Como as integrinas CD11b/CD18 estão presentes também nos monócitos e células *natural killer*, a MPO de neutrófilos pode modular também a ativação de outros leucócitos ligados à progressão de doenças inflamatórias crônicas (HARRIS et al., 2000; LIBBY, 2002). Portanto, a MPO exerce funções que são comuns às citocinas pró-inflamatórias potentes como TNF-α e IL-8 (LAU et al., 2005).

Enfim, a MPO não serve somente como um índice de recrutamento e ativação de neutrófilos, mas possui também propriedades tradicionais comuns às citocinas que modulam o estado de ativação de leucócitos em doenças inflamatórias. Inclusive, estão previstos estudos para definir se a ativação leucocitária dependente de MPO pode constituir numa estratégia terapêutica (LAU et al., 2005).

A elastase leucocitária é encontrada predominantemente nos grânulos azurófilos de neutrófilos e nos monócitos. Essa enzima possui um grande número de substratos da matrix extracelular, incluindo elastina, proteoglicanos, colágeno e fibronectina (OWEN et al., 1997; DENTENER et al., 1996; NÉNAN et al., 2005). Quando secretada no foco inflamatório a elastase pode causar lesões tissulares severas, o que possivelmente determinou a implicação dessa enzima em várias doenças inflamatórias, como bronquite, enfisema pulmonar, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica – DPOC, sepsis, asma, artrite e nefrite (MOHR & WESSINGHAGE, 1983; FUJITA et al., 1990; DHAINAUT et al., 2001; DEVINE, 2003; NÉNAN et al., 2005). Além disso, a elastase modula as funções de células inflamatórias, como linfócitos e plaquetas (OWEN et al., 1997).

A elastase neutrofílica produz várias características das doenças pulmonares, como a hiperplasia das glândulas produtoras de muco, o decréscimo na freqüência de batimentos ciliares e a lesão epitelial. Essa enzima causa ainda mudanças no sistema de defesa do



hospedeiro que facilita a colonização bacteriana (STOCKLEY et al., 2000). Por fim, VIGNOLA et al. (1998) mostraram que a inflamação das vias aéreas na asma e na bronquite crônica está associada com o aumento nos níveis de elastase ativa, que tem um papel fundamental no remodelamento das vias aéreas, ou melhor, da matrix extracelular onde a elastina é o componente principal.

Assim, o interesse pela descoberta de drogas que previnam os efeitos deletérios da elastase tem sido expressivo. Isso, porque os estudos com corticóides, agentes antiinflamatórios potentes, envolvendo pacientes ou ensaios *in vitro* têm produzido resultados considerados conflitantes (ABBINANTE-NISSEN et al., 1995; JANSEN et al., 1991). Além disso, mais recentemente Kamal et al. (2002) mostraram que a fluticasona inalada por voluntários saudáveis não teve efeito em nenhum dos componentes da relação elastase/anti-elastase a nível do trato respiratório (KAMAL et al., 2002).

Várias substâncias naturais isoladas de plantas tais como, antocianidinas, dihidrochalconas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, derivados do ácido caféico, triterpenos e ácidos graxos tiveram determinadas suas atividades inibidoras da elastase (MELONI et al., 1995; ROTONDO et al., 1998; SARTOR et al., 2002; DAELS-RAKOTOARISON et al., 2003). Contudo, a inibição da secreção de elastase parece ser mecanisticamente mais eficaz e interessante, como já foi observado para alguns compostos fenólicos (BENNET et al., 1981; SHOWELL et al., 1981; SIEDLE et al., 2003).

Um possível mecanismo pelo qual o ICPF e o AMB inibiram a infiltração de PMNs no peritônio de camundongos é através da inibição da secreção de enzimas lisossomais (elastase e MPO) por neutrófilos estimulados. Quanto a participação de moléculas de adesão no efeito do ICPF e do AMB, de maneira indireta, esses compostos ao reduzirem a secreção de MPO podem ter prevenido a participação das integrinas CD11b/CD18, que são essenciais para a adesão de PMNs via ligação às proteínas da matrix extracelular e moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar essa hipótese.

Um estudo recente (CHEN et al., 2004) avaliou o efeito do campferol, flavonóide que difere do ICPF apenas pela OH no C3 - anel C, na expressão da molécula de adesão ICAM-1 induzida pelo TNF $\alpha$  em células epiteliais do sistema respiratório. O campferol inibiu a expressão da ICAM-1 pela atenuação da atividade da JNK, pela expressão gênica de c-jun e pela atividade da AP-1 (proteína ativadora-1). Análise da relação estrutura-atividade mostrou a importância das hidroxilas nos carbonos 5 e 7 do anel A, e no carbono 4 do anel B, comuns ao campferol e ao ICPF, para ocorrência destes efeitos.

Portanto, a inibição do edema induzido por diferentes mediadores, da migração de células *in vivo*, associada a capacidade do ICPF e do AMB de inibirem a secreção de enzimas (mieloperoxidase e elastase) pelos neutrófilos humano, tornam esses compostos bons candidatos como drogas antiinflamatórias possivelmente úteis na terapia de doenças respiratórias caracterizadas pelo acúmulo de células inflamatórias.

Existem várias evidências que a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) contribui com a resposta inflamatória, além de estar associada a perda da função celular (HOLMDAHL et al., 1985; FORMAN & TORRES, 2001). O ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila são ROS produzidas principalmente na mitocôndria onde 90% do oxigênio celular é consumido (WU, 1998). Estudos mostram que os processos oxidativos têm um papel fundamental na inflamação através da ativação de quinases (JNK, MAPK, p38) e de fatores de transcrição sensíveis a reação redox tais como NFκB e AP-1, que regulam genes de mediadores inflamatórios e de antioxidantes, como a gamma-glutamilcisteína sintetase (síntese de GSH) e SOD-Mn (RAHMAN & MACNEE, 2000).

Para investigar se a atividade antiinflamatória do AMB está relacionada a uma possível ação antioxidante, foi avaliado o efeito do tratamento dos animais com AMB sobre a hepatotoxicidade induzida pelo tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) em ratos. O estudo envolveu a avaliação do efeito do AMB sobre as enzimas hepáticas, a peroxidação lipídica (MDA), o nível de glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da catalase, além da análise histopatológica do fígado.

O aumento na produção de radicais livres e o estresse oxidativo pode ser induzido por uma variedade de estímulos, incluindo radiações ionizantes, exposição à drogas e a xenobióticos, como CCl<sub>4</sub>, um típico agente hepatotóxico que exerce seus efeitos pela produção de radicais livres (MELIN et al., 2000; MICHIELS et al., 1994). Devido ao seu caráter lipossolúvel o CCl<sub>4</sub> atravessa as membranas celulares e deposita-se em órgãos como o fígado, cérebro, rins e coração (CASTILLO et al., 1992; ZHANG et al., 1989; RINCON et al., 1999). O tempo para entrada e eliminação do CCl<sub>4</sub> parece ser influenciado pela taxa de perfusão sanguínea e o conteúdo lipídico dos tecidos. O fígado e o cérebro são rapidamente atingidos pelo CCl<sub>4</sub>, sendo o fígado o órgão mais investigado quando no processo de intoxicação por esse produto (SANZGIR et al., 1997).

No presente estudo foi observado que a administração do CCl<sub>4</sub> causou um aumento na atividade de enzimas, notavelmente àquelas que são indicativas de necrose hepatocelular, como a AST e ALT. Entretanto, o tratamento dos animais com AMB reduziu

significativamente esse efeito, fato este que foi confirmado pela análise histológica. Na avaliação do efeito do AMB sobre a peroxidação lipídica induzida pelo CCl<sub>4</sub>, foi observado que o tratamento dos animais com o AMB reduziu consideravelmente os níveis de malonidialdeído (MDA) no fígado.

O CCl<sub>4</sub>, ao ligar-se aos lipídios e proteínas, produz degeneração peroxidativa de muitos tecidos (CASTILLO et al., 1992; CABRE et al., 2000; SIMIBE et al., 2001; MC LAY et al., 1976). Ele aumenta significativamente a liberação de enzimas hepáticas, causa destruição da citocromo P450, necrose hepatocelular e gera produtos da peroxidação lipídica, como o MDA e o 4-hidroxinonenol (MELIN et al., 2000; MICHIELS et al., 1994). A toxicidade do CCl<sub>4</sub> provavelmente depende da formação do radical CCl<sub>3</sub>, que na presença do oxigênio interage com este formando um produto mais tóxico, o CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. A peroxidação lipídica é iniciada pela interação desses radicais reativos do CCl<sub>4</sub> com os ácidos graxos insaturados e lipídios da membrana celular. A reação do MDA, produto da peroxidação lipídica, com grupos amino de proteínas pode levar a polimerização e inativação de enzimas, além da inibição da síntese protéica (BIRD et al., 1980; MELLO FILHO et al., 1983; HARTLEY et al., 1999; MELIN et al., 2000).

Na hepatotoxicidade causada pelo CCl<sub>4</sub>, as primeiras células danificadas são as da região centrolobular, onde as atividades enzimáticas são expressivas (EDWARD et al., 1993; CABRE et al., 2000; SIMIBE et al., 2001). Nesse processo, as células de Kupffer sensíveis às ações do CCl<sub>4</sub> liberam citocinas citotóxicas tais como IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$  (EDWARD et al., 1993; SHIGEKI & MASAYUKI, 1999). A expressão dessas citocinas ocorre através da ativação do NF $\kappa$ B durante as lesões agudas induzidas pelo CCl<sub>4</sub>. Um mediador primário na lesão hepática é provavelmente as ROS, que causam a ativação do NF $\kappa$ B, fator de transcrição envolvido na expressão de genes inflamatórios, além da produção de fatores implicados na necrose hepática, como enzimas proteolíticas e ROS. Assim, a hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> parece resultar de uma ação direta das ROS e de uma ação indireta, inflamatória (CZAJA et al., 1995; DECICCO et al., 1998).

Segundo Maurizio et al. (1992) os antioxidantes podem exercer seu efeito protetor contra as lesões hepáticas induzidas pelo CCl<sub>4</sub>, através da inibição da peroxidação lipídica, inativação de fatores de transcrição, como o NF $\kappa$ B, ou indução da expressão de enzimas antioxidantes. Portanto, pelo menos parte do efeito hepatoprotetor do AMB parece estar relacionado à sua habilidade de reduzir a peroxidação lipídica induzida pelo CCl<sub>4</sub>, que possivelmente se soma ao seu perfil antiinflamatório.

A dose sub-letal do  $\text{CCl}_4$  reduziu significativamente a concentração de GSH no fígado dos animais, enquanto o tratamento com AMB reverteu quase a normalidade esse efeito. A GSH, tripeptídeo com grupo tiol (sulfidril), é um dos agentes antioxidantes mais importante do sistema de defesa da célula, envolvida por exemplo, na detoxificação de agentes químicos e na eliminação de produtos da lipoperoxidação, além de ser requerida na síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE et al., 1989; GALLEANO & PUNTARULO, 1995). A GSH tem sido implicada na modulação da resposta imune e inflamatória, e seu estado oxidada/reduzida é crítico para vários eventos biológicos, incluindo a ativação da transcrição gênica de genes específicos, modulação de sinais de transdução regulados pela reação redox, regulação da proliferação celular, apoptose e inflamação (BROWN et al., 1994; ARRIGO, 1999; RAHMAN & MACNEE, 2000; HADDAD & HARB, 2005). Estudos (LI et al., 1994; RAHMAN & MACNEE, 1999; MORRISON et al., 1999) mostram que o nível de GSH é considerado crítico por exemplo, para o sistema de defesa antioxidante dos pulmões, por estar particularmente envolvida na proteção do epitélio das vias aéreas. Assim baixas concentrações de GSH nos pulmões contribuem para o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o que pode amplificar a resposta inflamatória e potencializar as lesões teciduais (RAHMAN & MACNEE, 1999, CANTIN et al., 1987).

A depleção de glutathiona aumenta a sensibilidade das células à várias agressões, por exemplo a lesão hepática induzida pelo consumo de álcool ou drogas (ex.: acetaminofem), as lesões pulmonares, provocada pelo fumo, e as musculares induzidas pelo excesso de atividade física (LEEUEWENBURGH & JI, 1995). No presente estudo, a diminuição nos níveis de GSH nos animais tratados com  $\text{CCl}_4$  pode ser esclarecida pelo consumo de GSH para a remoção de ROS e de produtos da lipoperoxidação gerados pela ação tóxica do  $\text{CCl}_4$ . Porém, nos animais pré-tratados com AMB a concentração de GSH foi restabelecida à quase normalidade, isso ocorreu possivelmente pela habilidade desse glucosídeo fenólico em reduzir os níveis de ROS e de produtos da lipoperoxidação.

A administração aguda do  $\text{CCl}_4$  aumentou significativamente a atividade da catalase, enquanto o tratamento dos animais com AMB reduziu esse efeito a níveis próximos à normalidade, ou seja, semelhantes aos do grupo de animais que não foram submetidos aos efeitos tóxicos do  $\text{CCl}_4$ .

A catalase é uma enzima chave do sistema de defesa antioxidante da célula, ela catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ . Estudos (BAE et al., 1997; LEE et al., 1998; ROBINSON et al., 1999) mostram que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser sintetizado endogenamente em certos tipos celulares em resposta à ativação por citocinas ou fatores de crescimento. Esse agente

oxidante atua então como um segundo mensageiro estimulando a cascata de proteínas quinases ligadas à expressão de genes inflamatórios ou ao controle do ciclo celular. Hensley et al. (2000) mostraram que tanto a IL-1 quanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ativam por fosforilação a quinase MAPK p38, de uma maneira que pode ser antagonizado pelo NAC, N-acetil-L-cisteína, que atua como precursor de GSH e tem sido utilizado terapeuticamente para elevar os níveis de GSH e reduzir a inflamação em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (Bridgeman et al., 1994).

Rohrdanz et al. (1998) observaram que a expressão gênica e a atividade da enzima catalase foram induzidas pela exposição de hepatócitos ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 h. Szymonk-Lesiuk et al. (2003) obtiveram resultados semelhantes em fígado de ratos, onde foi verificado um aumento na atividade da catalase 24 e 72h após à administração de CCl<sub>4</sub>. Portanto, o aumento na atividade da catalase observado no presente estudo está possivelmente relacionado a um aumento na expressão dessa enzima em função do acúmulo de ROS no fígado, provocado pelo CCl<sub>4</sub>. Nesse sentido, a redução na atividade da catalase promovida pelo AMB reflete um efeito antioxidante desse composto.

Galato et al. (2001) avaliaram o potencial antioxidante de alguns fenóis, tais como os ácidos caféico, para-cumárico e gálico, e observaram que quanto maior o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, maior a atividade antioxidante desses compostos. Assim, é possível que os grupos hidroxilas presentes no anel aromático do AMB (**Figura 2**) contribuam para sua atividade antioxidante. Esse efeito é um achado importante considerando que o aumento na produção de radicais livres tem sido implicado na hiperreatividade das vias aéreas observada na asma (NEIJENS et al., 1984; MELTZER et al., 1988).

A possibilidade que os compostos fenólicos estudados combinem os efeitos antioxidante e/ou antiinflamatório com a atividade relaxante muscular é particularmente atrativa para o tratamento de afecções respiratórias tais como a asma, principal uso do cumaru na medicina tradicional.

No presente estudo o ICPF e o AMB relaxaram de maneira concentração-dependente a resposta contrátil induzida pelo CCh ou KCl em traquéia isolada de cobaia. Vale ressaltar que o ICPF mostrou-se mais potente que a teofilina, inibidor não seletivo da enzima fosfodiesterase. Além disso, foi observado também que o ICPF apresentou-se mais potente na presença do KCl, sendo capaz de reverter completamente o tonus muscular. Esses resultados sugerem que o ICPF e o AMB são pelo menos em parte responsáveis pelo efeito relaxante muscular de *A. cearensis*, demonstrado anteriormente (LEAL et al., 2003).

O ICPF e o AMB induziram um relaxamento no músculo pré-contraído pelo CCh ou KCl, que estendeu-se além do tônus basal. Esse resultado nos surpreendeu considerando que foi observado apenas um leve relaxamento no tonus basal em parte dos experimentos. Além disso, as avaliações foram realizadas na presença de indometacina para prevenir a influência de prostanoídes (MIURA et al., 1997; VAALI et al., 1998).

A lesão do epitélio brônquico na asma com perda da barreira de proteção expõe as estruturas mais profundas das vias aéreas à fatores exógenos como alérgenos, vírus e poluentes atmosféricos, além dos componentes endógenos como as enzimas proteolíticas (ex.: elastase, MPO, proteína básica principal e peroxidase eosinofílica). Em certos pacientes com asma, a resposta epitelial à injúria é falha, conduzindo a um longo e anormal processo de reparação, que resulta em alterações estruturais, coletivamente chamadas de remodelamento brônquico, que implica em mudanças estruturais no epitélio, (mio)fibroblastos, matriz extracelular (incluindo membrana basal) e músculo liso (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998; MAUAD et al., 2000; BHARADWAJ & AGRAWAL, 2004).

As células epiteliais das vias aéreas constituem uma barreira física que protegem os nervos sensoriais e o músculo liso da estimulação por irritantes inalados, além disso, elas participam na regulação da reatividade brônquica. Tem sido mostrado que as células epiteliais liberam mediadores inibitórios do tonus muscular tais como prostaglandina E<sub>2</sub> e óxido nítrico (ON) (FOLKERTS & NIJKAMP, 1998; SPICUZZA et al., 2002).

Na traquéia destituída de epitélio o ICPF e o AMB mantiveram seu efeito relaxante, além do que o efeito relaxante do ICPF foi significativamente mais potente em relação à preparação com epitélio. Isso sugere que os efeitos relaxantes do ICPF e do AMB são epitélio independente. Holroyde (1986) demonstrou que a supersensibilidade à serotonina, histamina, adenosina, isoprenalina e em menor grau ao KCl, produzida pela remoção do epitélio traqueal de cobaia não foi devido a ausência de fator relaxante, mas sim a ausência física de uma barreira. Assim, é possível que o aumento do efeito relaxante do ICPF observado na traquéia sem epitélio esteja relacionado a uma maior concentração do flavonóide a nível das células musculares.

As ROS têm um papel fisiológico importante, mas podem causar efeitos indesejáveis aos tecidos quando produzidos em excesso ou durante a ausência de quantidades suficientes de antioxidantes. Assim, esses mediadores têm sido implicados na patogênese de várias doenças inflamatórias das vias aéreas, incluindo a asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica - DPOC (HENRICKS & NIJKAMP, 2001). Em trabalho recente, Casoni et al. (2003) mostraram que a GSH inibe a broncoconstrição induzida por vários estímulos (ex.: carbacol,

histamina e alérgenos) e que durante a resposta contrátil são produzidos radicais livres. Dessa forma, o efeito relaxante muscular do AMB em traquéia de cobaia pode estar pelo menos em parte relacionado à sua atividade antioxidante.

O ON em condições fisiológicas ou patológicas como na asma, desempenha uma função importante na regulação das funções das vias aéreas (SPICUZZA et al., 2002). Tem sido demonstrado que compostos doadores de ON, relaxam o músculo liso traqueal via ativação dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP por mecanismo dependente de GMP cíclico (KATSUKI & MURAD, 1977; KUBO et al., 1993). Nas vias aéreas o ON pode ser liberado também por neurônios sensoriais (VAALI et al., 2000). Parte do efeito relaxante do ICPF parece envolver a liberação de ON por neurônios, considerando que o L-NAME em traquéia com ou sem epitélio reduziu significativamente o efeito do ICPF. Além disso, o ODQ, inibidor seletivo da guanilato ciclase (GC), também reduziu significativamente o efeito do ICPF. Dessa forma, os nossos resultados sugerem que o relaxamento muscular induzido pelo ICPF é mediado pela ativação da via ON/GC/GMPc. É conhecido que o acúmulo de GMPc pode levar à expressão de proteína quinase dependente de GMP (PKG), que por sua vez estimula o efluxo de  $K^+$  e causa o relaxamento muscular (WU et al., 2005).

Evidências anteriores (LINCOLN & CORNWELL, 1991; BOLOTINA et al., 1994; ABDERRAHMANE et al., 1998) mostram que o ON é capaz de estimular os canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{2+}$  em células musculares lisas, incluindo as vias aéreas, causando um decréscimo no influxo de  $Ca^{2+}$  e relaxamento muscular.

As células musculares lisas das vias aéreas expressam vários tipos de canais de  $K^+$  que desempenham funções importantes determinando o potencial de membrana de repouso, a estabilidade elétrica relativa e a responsividade de agentes contráteis e relaxantes. Além disso, esses canais estão também envolvidos na modulação da liberação de neurotransmissores por neurônios nas vias aéreas (PELAIA et al., 2002). Um indicativo da possível participação dos canais de  $K^+$  no efeito relaxante do ICPF em traquéia de cobaia, foi a redução significativa do seu efeito na presença de alta concentração de KCl (120 mM). Adicionalmente, nessas circunstâncias a glibenclamida não interferiu no efeito relaxante do ICPF, enquanto que o contrário foi observado na presença de uma menor concentração de KCl (40 mM).

Vaali et al. (1998) demonstraram que no músculo traqueal pré-contraído por KCl (40 mM), o efeito relaxante de doadores de ON foi reduzido significativamente pela IbTX. Nielsen (1996) mostrou que o cromacalim, protótipo dos abridores de canais de  $K^+$ , relaxou as contrações induzidas por 20 e 30 mM de KCl, mas não teve efeito na contração induzida por 124 mM, enquanto o pinacidil relaxou o músculo em todas as concentrações investigadas.

Além disso, recentemente Gopalakrishnan et al (2004) mostraram que o A-151892, naftilamida, inibiu completamente a contração induzida pelo KCl (25 mM) em aorta de rato, mas praticamente não interferiu na despolarização induzida pelo KCl (80 mM). Segundo os autores o efeito observado constitui num indicativo que o efeito relaxante do A-151892 é dependente dos canais de potássio.

Assim, considerando as condições experimentais em que foram realizados os estudos com ICPF, o tônus induzido por 40 mM de KCl (49 % da resposta máxima) possivelmente ainda permite a ação de abridores de canais de  $K^+$ , ou seja nessas circunstâncias abridores de canais de  $K^+$  não possuem um papel negligenciável. Dessa forma, os resultados sugerem que o efeito relaxante do ICPF é mediado por canais de  $K^+$ , contudo, outro mecanismo de ação independente dos canais de  $K^+$  pode também estar envolvido.

Canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  têm sido identificados no músculo liso das vias aéreas de cobaias e de outras espécies (HISADA et al., 1990; KOTLIKOFF, 1990). Segundo Galvez et al. (1990), a iberiotoxina (IbTX) e a charibidotoxina (ChTX) ligam-se em diferentes sítios nos canais de  $K_{Ca}$  e modulam a atividade desses canais por mecanismos distintos. Além disso, a ChTX é conhecida por inibir pelo menos três tipos de canais de  $K^+$  voltagem-dependente (HERMANN & ERXLEBEN, 1989; VÁZQUEZ et al., 1990), enquanto a IbTX bloqueia seletivamente os canais de  $K_{Ca}$  (CANDIA et al., 1992). No presente estudo a IbTX inibiu significativamente o efeito relaxante do ICPF no músculo pré-contraído por KCl (40 mM), sugerindo portanto a participação dos canais de  $K_{Ca}$  no efeito do ICPF.

A 4-aminopiridina (4-AP), constitui uma ferramenta farmacológica muito útil para estudar os canais  $K^+$  voltagem dependente, por não afetar os canais de  $K_{Ca}$  (BOYLE et al., 1992). Hisada et al (1990) demonstraram que na traquéia de cobaia existem correntes sensíveis à 4-AP, entretanto o efeito relaxante do ICPF em traquéia de cobaia não foi afetado significativamente pela presença da 4-AP.

O envolvimento de receptores adrenérgicos no efeito relaxante do ICPF foi observado pela inibição de seu efeito pelo propranolol, antagonista competitivo não seletivo de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Contudo, estudos adicionais são necessários para confirmar a participação do sistema adrenérgico.

Estudos mostram que a inflamação neurogênica nas vias aéreas tem um papel importante na patogênese da asma (JOOS & PAUWELS, 2001; BARNES, 1996). Murai et al (1992) utilizando antagonistas de taquicininas demonstraram que a inflamação nas vias aéreas é gerada por taquicininas liberadas por neurônios sensoriais aferentes sensíveis à capsaicina (fibras C), que são estimulados por vários tipos de irritantes como a fumaça de cigarros



(MORIMOTO et al., 1992) e o ar frio (YOSHIHARA et al., 1995). Esses irritantes ativam as fibras C pela abertura de canais iônicos com alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  (CATERINA et al., 1997).

A estimulação das fibras C leva a liberação de vários neuropeptídeos, tais como substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que exercem várias reações respiratórias (HOLZER, 1988). Estudos anteriores (ICHINOSE & BARNES, 1990; STRETTON et al., 1992) mostraram que os canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  e  $\text{K}_{\text{Ca}}$  possuem modulação inibitória na ativação das fibras C. No presente estudo, a depleção de neuropeptídeos pelo tratamento com capsaicina reduziu significativamente a ação relaxante do ICPF. Assim, considerando o perfil ativador de canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  e  $\text{K}_{\text{Ca}}$  do ICPF, é possível que parte do efeito relaxante desse 3-metilflavonol esteja relacionado à inibição do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e conseqüentemente da liberação de neuropeptídeos pelas fibras C.

Dessa forma, os nossos resultados mostram que o efeito relaxante do ICPF é epitélio independente e resulta de várias ações intracelulares, mas que possui uma via comum final às ativações dos canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  e  $\text{K}_{\text{Ca}}$  (**Figura 40**).

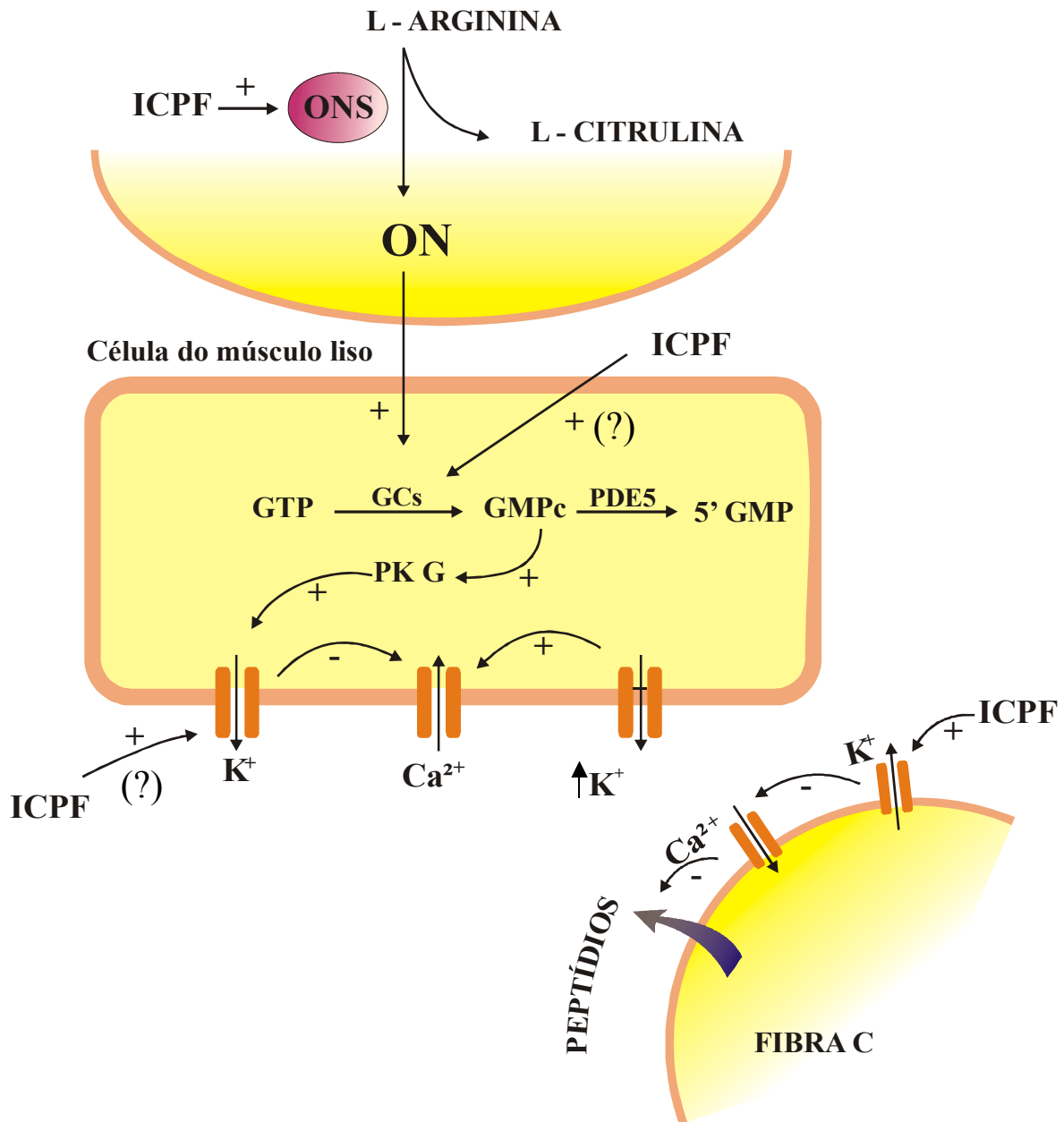
As características fisiopatológicas da asma incluem obstrução, inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas (BUSSE & LEMANSKE, 2001; KUMAR, 2001), resultantes de interações complexas entre células, inflamatórias e estruturais, e mediadores inflamatórios. Inúmeros estímulos (alérgenos, poluentes ambientais, vírus e outros) podem induzir o processo asmático, através do acúmulo e da ativação de tipos celulares, destacando-se mastócitos (fase aguda) e eosinófilos (fase crônica), além de outras células também importantes como linfócitos, macrófagos e neutrófilos, responsáveis pela síntese e/ou liberação de vários mediadores inflamatórios, incluindo histamina, citocinas, ROS e enzimas (MPO, elastase, peroxidase eosinofílica). Assim, as ações conjuntas desses mediadores propiciam alterações significativas que levam à hiperresponsividade e ao remodelamento das vias aéreas e conseqüentemente perda do limite de broncoconstrição (MAUAD et al., 2000).

Dessa forma, o bloqueio do aumento da permeabilidade vascular, da migração e ativação de leucócitos (neutrófilos) e conseqüente prevenção dos danos causados pela ação das enzimas MPO e da elastase, somados à ação antioxidante e relaxante muscular do ICPF e/ou do AMB, tornam esses compostos potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias das vias aéreas, como a asma, principalmente na fase inicial da doença (**Figura 41**). Contudo, estudos adicionais avaliando por exemplo, o efeito desses compostos sobre a eosinofilia e a síntese e/ou liberação de mediadores inflamatórios como citocinas e

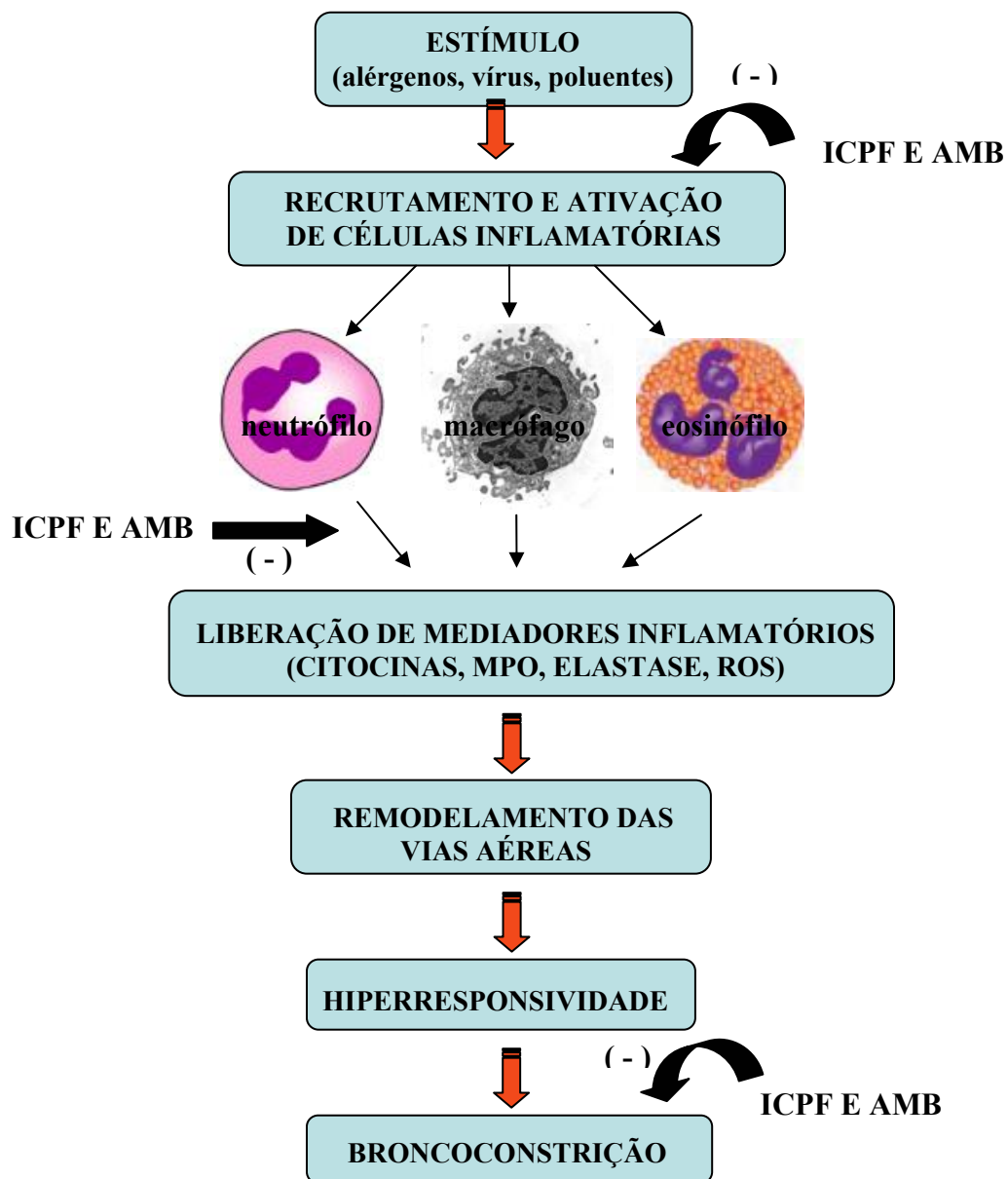
leucotrienos é particularmente interessante, considerando as características fisiopatológicas da asma.

Por fim, os resultados demonstram que o AMB e o ICPF possuem baixa citotoxicidade nos tipos celulares investigados (hepatócitos e neutrófilos), e apresentam atividades antiinflamatória e/ou antioxidante, além do efeito relaxante muscular em traquéia de cobaia. Assim, as atividades farmacológicas do ICPF e do AMB comprovam que esses derivados fenólicos podem justificar pelo menos em parte o uso tradicional de *Amburana cearensis*, no tratamento de doenças das vias aéreas, como a bronquite e a asma, principais indicações tradicionais da planta.

É importante registrar que os resultados apresentados nesse estudo constituem num incentivo para investirmos no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, empregando como matéria-prima ativa as cascas do caule de *A. cearensis*. Além disso, a bioatividade do ICPF e do AMB os tornam, ao lado da cumarina, aptos a serem utilizados como marcadores no controle de qualidade de produtos derivados da planta. Contudo, para isso estudos adicionais são ainda necessários.



**Figura 40.** Proposta para o mecanismo de ação relaxante muscular do isocampferídio (ICPF) em traquéia isolada de cobra. A ativação da via ON/GCs/GMPc pelo ICPF causa um aumento nos níveis de GMPc e conseqüentemente ativação da proteína quinase G (PKG). A PKG por sua vez, estimula o efluxo de K<sup>+</sup> levando a uma redução no influxo de Ca<sup>2+</sup> e ao relaxamento da célula muscular lisa. Além disso, o ICPF pode ter um efeito direto nos canais K<sup>+</sup>. Adicionalmente, a abertura dos canais de K<sup>+</sup> nas fibras C pelo ICPF pode causar uma redução na liberação de neuropeptídios, tais como substância P e neurocininas. + = ativação; - = inibição. Modificado de WU et al., 2005.



**Figura 41.** Prováveis sítios de ações do isocampferídio (ICPF) e do amburosídio A (AMB) isolados de *A. cearensis* na asma. O ICPF e o AMB ao reduzirem a migração e ativação de leucócitos, particularmente neutrófilos, previnem os efeitos danosos de enzimas (MPO e elastase) implicadas na produção de ROS, hiperplasia das glândulas produtoras de muco, lesão epitelial das vias aéreas e ativação de outros tipos celulares que amplificam a resposta inflamatória. Adicionalmente, a ação sequestradora de radicais livres e relaxante muscular podem aliviar a broncoconstrição e a hiperresponsividade das vias aéreas. (modificado de MAUAD et al., 2000). - = inibição.

---

## CONCLUSÕES



## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo com o isocampferídio (ICPF, 3-metilflavonol) e o amburosídio A (AMB, glucosídeo fenólico) isolados de *A. cearensis* nos permitem as seguintes conclusões:

- Apenas o ICPF mostrou citotoxicidade à células hepáticas de ratos, enquanto em neutrófilos humano o ICPF à semelhança do AMB não interferiram significativamente na viabilidade celular.
- O ICPF e o AMB possuem atividade antiedematogênica observada pela inibição do edema de pata induzido por carragenina, PGE<sub>2</sub>, dextrano, histamina ou serotonina em ratos ou camundongos.
- A atividade antiedematogênica do ICPF e do AMB foi corroborada por suas habilidades em prevenir o aumento da permeabilidade vascular e o acúmulo de células inflamatórias nos modelos de edema de pata e peritonite em camundongos.
- Possivelmente a atividade antiedematogênica dos compostos fenólicos investigados está relacionada a um bloqueio da síntese, liberação e/ou até mesmo da ação de mediadores como PGE<sub>2</sub>, histamina e serotonina.
- A inibição da migração de células para o foco inflamatório pelo ICPF e pelo AMB parece está relacionada ao bloqueio da degranulação de neutrófilos, prevenindo assim à ação de enzimas como mieloperoxidase e elastase.
- O AMB mostrou uma ação hepatoprotetora que está possivelmente relacionada à sua atividade antioxidante.
- O efeito antioxidante do AMB ocorreu pelo bloqueio de efeitos tóxicos induzidos pelo estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica.
- O AMB possui uma ação seqüestradora de radicais livres, observada pelas medidas de sistemas de defesas antioxidantes enzimático (catalase) e não enzimático (glutathiona reduzida).
- Tanto o ICPF quanto o AMB possuem ação relaxante muscular epitélio independente.
- Parte do efeito relaxante do ICPF é mediado pela ativação da via ON/GCs/GMPc e pela abertura de canais de K<sup>+</sup>, além de interferir na liberação de neuropeptídios, tais como substância P e neurocinina A pelas fibras C.

- O efeito relaxante do ICPF resulta de várias ações intracelulares apresentando, porém uma via comum a abertura dos canais de  $K^+$  sensíveis ao  $Ca^{2+}$  e ao ATP. Contudo, um mecanismo independente dos canais de  $K^+$  pode está também envolvido.
- As atividades antiinflamatória, relaxante muscular e/ou antioxidante do ICPF e do AMB obtidos de *A. cearensis* são importantes e justificam pelo menos em parte o principal uso tradicional da planta, que envolve doenças respiratórias caracterizadas pela inflamação, estresse oxidativo e/ou broncoconstrição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---





## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBINANTE-NISSEN, J.M., SIMPSON, L.G., LEIKAUF, G.D. Corticosteroids increase secretory leukocyte protease inhibitor transcript levels in airway epithelial cells. **American Journal of Physiology**, v. 268, p. L601-606, 1995.

ABDERRAHMANE, A., SALVAIL, D., DUMOULIN, M., GARON, J., CADIEUX, A., ROUSSEAU, E. Direct activation of K(Ca) channel in airway smooth muscle by nitric oxide: involvement of a nitrothiosylation mechanism? **American Journal of Respiration and Cellular Molecular Biology**, v. 19, p. 485-497, 1998.

ACHARYA, J., PUNCHARD, N.A., TAYLOR, J.A., THOMPSON, R.P.H., PEARSON, T.C. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. **European Journal of Haematology**, v. 47, p. 287-91, 1991.

ADNER, M., ROSE, A.C., ZHANG, Y., BENSON, M., UDDMAN, R., SHANKLEY, N.P., CARDELL, L. An assay to evaluate the long-term effects of inflammatory mediators on murine airway smooth muscle: evidence that TNF $\alpha$  up-regulates 5-HT<sub>2A</sub>-mediated contraction. **British Journal of Pharmacology**. v.137, p. 971-982, 2002.

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of enzymatic analysis**. v.2, p. 673 – 78, 1984.

AHERNE, W. Quantitative methods in histology. **Journal of Medical Laboratory Technology**, v. 27, p. 160-170, 1970.

AKSOY, M.O.; MURPHY, R.A.; KAMM, K.E. Role of Ca<sup>++</sup> and myosin light chain phosphorylation in regulation of smooth muscle. **American Journal of Physiology – Cell Physiology**. v. 242, p.109-116, 1982.

ALEXANDER, S.P.H., PETERS, J.A. Receptor & ion channel nomenclature supplement. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21 (Suppl.), p. 106-112, 2000.

ALLEN, R.C., STEVERIS, D.L. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 5 , p. 389-398, 1992.

AMERICAS REGIONAL WORKSHOP. *Amburana cearensis*. In: **IUCN 2003**. IUCN Red List of threatened Species ([www.redlist.org/search/details.php?species=32291](http://www.redlist.org/search/details.php?species=32291)).

ANDERSON, J.W., FISHER, J.T. Capsaicin-induced reflex bronchoconstriction in the newborn. **Respiration Physiology**, v. 93, p. 13-27, 1993.

ANDREWS, P.C., KRINSKY, N.I. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half, producing enzymically active hemi-myeloperoxidase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 256, p. 4211-4218, 1981.

ARNHOLD, J. Free radicals-friends or foes? Properties, functions and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.

ARNHOLD, J. Neue Ergebnisse über die Knorpelschädigung bei Rheuma. Disponível em : <<http://www.uni-leipzig.de/~biophys/arnhold.htm#Seitenanfang>>. Acesso em: 23 jan, 2006.

BABU, K.S., ARSHAD, S.H., HOLGATE, S.T. Omalizumab, a novel anti-IgE therapy in allergic disorders. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 1, p. 1049-1058, 2001.

BAE, Y. S., KANG, S. W., SEO, M. S., BAINES, I. C., TEKLE, E., CHOCK, P. B., RHEE, S. G. Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 217-221, 1997.

BAGGIOLINI, M., BRETZ, U., DEWALD, B., FEIGENSON, M.E. The polymorphonuclear leukocyte. **Agents Actions**. v. 8, p. 1287-96, 1978.

BAGGIOLINI, M., HIRSCH, J.G., DE DUVE, C. Resolution of granules from rabbit heterophil leukocytes into distinct populations by zonal sedimentation. **Journal of Cell Biology**. v. 40, p. 529-41, 1969.

BALDUS, S., EISERICH, J.P., MANI, A., CASTRO, L., FIGUEROA, M., CHUMLEY, P., MA, W., TOUSSON, A., WHITE, C.R., BULLARD, D.C. et al. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1759-1770, 2001.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I.K., XIONG, Q., HASE, K. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 456-460, 2000.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., TRAN, K.Q., TANAKA, K., SAIKI, I., KADOTA, S. Methyl quadrangularates A – D and related triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, p. 496 – 504, 2000.

BARBOSA, M.C. de A. Alguns aspectos morfológicos da folha de *Amburana cearensis* (Fr. All.) A. C. Smith, ocorrente em áreas de agreste e caatinga do Nordeste. **Brasil Florestal**, v. 53, p. 43-48, 1983.

BARILE, F.A., DIERICKX, P.J., KRISTEN, U. In vitro cytotoxicity testing for prediction of acute human toxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, p. 155-162, 1994.

BARNES, P.J. Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. **European Respiratory Journal**, v. 8, p. 457-462, 1995.

BARNES, P.J. Cytokine modulators as novel therapies for asthma. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 81-98, 2002.

BARNES, P.J. Neural control of human airways in health and disease. **American Review of Respiratory Disease**. v. 134, p.1289-1314, 1986.

BARNES, P.J. Neuroeffector mechanisms: The interface between inflammation and neuronal responses. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, p. S73-S83, 1996.

BARNES, P.J., CHUNG, K.F., PAGE, C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 515-596, 1998.

- BASTE, A., HAENEN, G.R.M.M., DOELMAN, C.J.A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 2-13, 1991.
- BATISTA, I.F.C., OLIVA, M.L.V., ARAUJO, M.A., SAMPAIO, M.U. Primary structure of a Kunitz trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, v. 4, p. 1017-1022, 1996.
- BAZZONI, F., CASSATELLA, M.A., ROSSI, F., CESKA, M., DCWALD, B., BAGGIOLINI, M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 771-774, 1991.
- BEASLEY, R., THOMSON, C., PEARCE, N., Selenium, Glutathione Peroxidase and Asthma. **Clinical Experimental Allergy**, v. 21, p. 157-9, 1991.
- BEAVO, J.A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. **Physiological Reviews**, v. 75, p. 725-748, 1995.
- BELAAOUAJ, A. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 1259-1264, 2002.
- BELVISI, M.G.; MIURA, M.; STRETTON, D.; BARNES, P.J. Endogenous vasoactive intestinal peptide and nitric oxide modulate cholinergic neurotransmission in guinea-pig trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 231, p. 97-102, 1993.
- BENNETT, J.P., GOMPERTS, B.D., WOLLENWEBER, E. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. **Arzneimittel-Forschung Drug Research**, v. 31, p. 433-437, 1981.
- BENOFF, S. Voltage dependent calcium channels in mammalian spermatozoa. **Frontiers in Bioscience**, v.3, p. dl220-dl240, 1998.
- BERNAREGGI, M.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., GIEMBYCZ, M.A. Anti-spasmodic activity of isoenzyme-selective phosphodiesterase inhibitors in guinea-pig trachealis. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 327-336, 1999.
- BHARADWAJ, A., AGRAWAL, D.K. Immunomodulation in asthma: a distant dream or a close reality? **International Immunopharmacology** v. 4, p. 495-511, 2004.
- BIBI, H., SCHLESINGER, M., TABACHNIK, E., SCHWARTZ, Y., ISCOVITZ, H., IAINA, A. erythrocyte glutathione peroxidase activity in asthmatic children. **Annals of Allergy**, v. 61, p. 339-40, 1988.
- BODI, W., WEI, A.Z., HUBER, R., MEYER, E. X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. **EMBO Journal**, v. 5, p. 2453-2458, 1986.
- BOLOTINA, V.M., NAJIBI, S., PALACINO, J.J., PAGANO, P.J., COHEN, R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, p. 850-853, 1994.

BOOTMAN, M.D., COLLINS, T.J., PEPPIATT, C.M., PROTHERO, L.S., MACKENZIE, L., DE SMET, P. TRAVERS, M., TOVEY, S.C. Calcium signalling-an overview. **Seminars in Cell and Development Biology**, v. 12, p. 3-10, 2001.

BOOTMAN, M.D., BERRIDGE, M.J., RODERICK, H.L. Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. **Current Biology**, v. 12, p. R563-565, 2002.

BORN, S.L., CAUDILL, D., SMITH, B.J., LEHMAN-MCKEEMAN, L.D. In vitro kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: application to species differences in toxicity and carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v. 58, p. 23-31, 2000.

BORREGAARD, N., COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-3521, 1997.

BOS, A., VEVER, R., ROOS, D. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 525, p. 37-44, 1987.

BOULAY, F., TARDIFF, M., BROUCHON, L., VIGNAIS, P. Synthesis and use of a novel N-formyl peptide derivative to isolate a human H-formyl peptide receptor cDNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 168, p. 1103-1109, 1990.

BOVERIS, A., CADENAS, E., REITER, R., CHANCE, B., JAMIESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 703-19, 1986.

BOWLER, R.P., CRAPO, J.D. Oxidants stress in allergic respiratory diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, p. 349-356, 2002.

BOYLE, J.P., TOMASIC, M., KOTLIKOFF, M.I. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 447, p. 329-350, 1992.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. v. 21, p. 77 - 89, 1968.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**. v. 78, p. 206-9, 1982.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3<sup>a</sup> Ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1976, p. 219.

BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA – CASA CIVIL, SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Decreto N<sup>o</sup> 5.459**, de 7 de janeiro de 2005.

BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA – CASA CIVIL, SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Medida Provisória N<sup>o</sup> 2.186-16**, de 23 de agosto de 2001.

BRAVO, B.; SAUVAIN, M. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, p. 71-74, 1999.

- BREYER, R.M., BAGDASSARIAN, C.K., MYERS, S.A., BREYER, M.D. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 661-690, 2001.
- BRIDGEMAN, M.M.E., MARSDEN, M., MACNEE, W., FLENLEY, D.C., RYLE, A.P. Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. **Thorax**, v. 46, p. 39-42, 1991.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal plants**. 2<sup>nd</sup> Ed., Paris: Lavoisier Publishing, 1999.
- BRYAN, S.A.; O'CONNOR, B.J.; MATTI, S. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. **Lancet**, v. 356, p. 2149-2153, 2000.
- BURG, N.D., PILLINGER, M.H. The neutrophil function and regulation in innate and humoral immunity. **Clinical Immunology**, v. 99, p. 7-17, 2001.
- BURNER, U., FURTMUELLER, P.G., KETTLE, A.J. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 20597-20601, 2000.
- BURNER, U., JANTSCHKO, W., OBINGER, C. Kinetics of oxidation of aliphatic and aromatic thiols by myeloperoxidase compounds I and II. **FEBS Letters**, v. 443, p. 290-296, 1999.
- BUSSE, M.M.; LEMANSKE, R.F. Asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 350-62, 2001.
- CABRE, M., COMPS, J., PATERNAIN, J.L., FERRE, N., JOVEN, J. Time course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 694-699, 2000.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, p. 26-36, 2005.
- CANDEIAS, L.P., PATEL, K.B., STRATFORD, M.R.L., WARDMAN, P. Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. **FEBS Letters**, v. 333, p. 151-153, 1993.
- CANDIA, S., GARCIA, M.L., LATORRE, R. Mode of action of iberiotoxin, a potent blocker of the large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. **Biophysical Journal**, v. 63, p. 583-590, 1992.
- CANUTO, K.M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Herisantia tiubae* (K. Schumann) Briz e *Amburana cearensis* (fr. Allem.) A. C. Sm.** 123 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, 2002.
- CANUTO, K.M.; LEAL, L.K.A.M.; VIANA, G.S.B.; BEZERRA, A.M.E.; SILVEIRA, E. R.. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (química, agronomia e farmacologia) de *A. cearensis*. In: XVIII **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Manaus, AM, 2004.

CARAMORI, G., PAPI, A. Oxidants and asthma. **Thorax**, v. 59, p. 170-173, 2004.

CARLSON, M.G.C., PETERSON, C.G.B., VENGE, P. Human eosinophil peroxidase: purification and characterization. **Journal of Immunology**, v. 134, p. 1875-1879, 1985.

CARLTON, B.D., AUBRUN, J.C. AND SIMON, G.S. Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and Cd-1 mice. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 30, p. 145-151, 1996.

CARLTON, B.D., AUBRUN, J.C. AND SIMON, G.S. Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and Cd-1 mice. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 30, p. 145-151, 1996.

CARVALHO, J.C.T., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterocíclicos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

CASSATELLA, M.A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BERTAGNIN, A., LUSTER, A.D., MCDONALD, P.P. Regulated production of IP-10 in human neutrophils. **European Journal of Immunology**. v. 27, p.111-115, 1997.

CASSATELLA, M.A., Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Advances in Immunology**. V. 73, p. 369-509, 1999.

CASTILLO, T., KOOP, D. R., KAMIMURA, S., TRIADAFILOPOULOS, G., TSUKAMODO, H. Role of cytochrome P-450 2E ethanol-carbon tetrachloride- and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. **Hepatology**, v. 16, p. 992-996, 1992.

CATERINA, M.J., SCHUMACHER, M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D., JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHEN, C.C., CHOW, M.P., HUANG, W.C., LIN, Y.C., CHANG, Y.J. Flavonoids inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor-kappaB: structure-activity relationships. **Molecular Pharmacology**, v. 66, p. 683-693, 2004.

CHENG, J.F., CHEN, M., WALLACE, D., TITH, S., ARRHENIUS, T., KASHIWAGI, H., ONO, Y., ISHIKAWA, A., SATO, H., KOZONO, T., SATO, H., NADZAN, A.M. Discovery and structure-activity relationship of coumarin derivatives as TNF-alpha inhibitors, **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters** , v. 14, p.2411-2415, 2004.

CICHETTI, G., ALLEN, P.G., GLOGAUER, M. Chemotactic signaling pathways in neutrophils from receptor to actin assembly. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, p. 220-228, 2002.

CLODIUS, L., PILLER, N.B. Conservative therapy for postmastectomy lymphedema. **Cirurgia Plastica**, v. 4, p. 193-202, 1978.

- COBURN, R.F., YAMAGUCHI, T. Membrane potential-dependent and independent tension in the canine tracheal muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 201, p. 276-284, 1977.
- COBURN, R.F.; TOMITA, T. Evidence for nonadrenergic inhibitory nerves in the guinea pig trachealis muscle. **American Journal of Physiology**, v. 224, p. 1072-1080, 1973.
- COHEN, A.J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 17, p. 277-289, 1979.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v. 420, p. 885-891, 2002.
- COLES, B.F., KADLUBAR, F.F. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? **Biofactors**, v. 17, p. 115-130, 2003.
- COLERIDGE, H.M., COLERIDGE, J.C.G. Airway axon reflexes-where now? **News Physiology Science**, v. 10, p. 91-96, 1995.
- COLERIDGE, J.C., COLERIDGE, H.M. Afferent vagal C fibre innervation of the lungs and airways and its functional significance. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 99, p. 1-110, 1984.
- COMHAIR, S.A., ERZURUM, S.C. Antioxidant response to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, p. L246-255, 2002
- COOKSON, W. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **Nature**, v. 402, 1999.
- CORDELL, G.A. Biodiversidade and drug discovery – a simbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.
- CORRÊA, P.M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 2., p. 475.
- COSTA-LOTUFO, L.V., JIMENEZ, P.C., WILKE, D.V., LEAL, L.K.A.M., CUNHA, G.M., VIANA, G.S.B.. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C.Smith. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 675-680, 2003.
- CUNHA, F.M., FRÖDE, T.S., MENDES, G.L., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. **Life Sciences**, v. 70, p. 159-169, 2001.
- CYBULSKY, M.I., MCCOMB, D.J., MOVAT, H.Z. Protein synthesis dependent and independent mechanism of neutrophil emigration. **American Journal of Pathology**, v.135, p.227-235, 1989.

- CZAJA, M.J., XU, J., ALT, E. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. **Gastroenterology**, v. 108, p. 1849-1854, 1995.
- DAELS-RAKOTOARISON, D.A., KOUAKOU, G., GRSSIER, B., DINE, T., BRUNET, C., LUYCKX, M., BAILLEUL, F., TROTIN, F. Effects of a caffeine-free Cola nitida nuts extract on elastase $\alpha$ -1-proteinase inhibitor balance. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p. 143-150, 2003.
- DAUGHERTY, A., DUNN, J.L., RATERI, D.L., HEINECKE, J.W. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical investigations**, v. 94, p. 437-44, 1994.
- DE MEYER, N., HAEMERS, A., MISHRA, L. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 34, p. 299-302, 1991.
- DECICCO, L.A., RIKANS, L.E., TUTOR, C.G., HORNBROOK, K.R. Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta following administration of carbon tetrachloride to male rats. **Toxicology Letters**, v. 98, p. 115-121, 1998.
- DELVES, P.J., ROITT, I.M. N. The Immune System- First of Two Parts. **New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 37-49, 2000.
- DENEKE, S.M., FANBURG, B.L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology**, v. 257, p. L163-173, 1989.
- DENTENER, M.A., FRANCO, G.J., BUURMAN, W.A. Bacterial/permeability-a lipopolysaccharide-specific protein on the surface of human peripheral blood monocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 252-255, 1996.
- DEVINE, D.A. Antimicrobial peptides in defense of the oral and respiratory tracts. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 431-443, 2003.
- DHAINAUT, J.F., MARIN, N., MIGNON, A., VINSONNEAU, C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. **Journal of Surgical Research**, v. 99, p. 245-252, 2001.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.
- DI ROSA, M., GIROUD, J.P., WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971a.
- DI ROSA, M., PAPADIMITRIOU, J.M., WILLOUGHBY, D.A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pathology**, v. 105, p. 239-256, 1971b.
- DILLON, P.F.; AKSOY, M.O.; DRISKA, S.P.; MURPHY, R.A. Myosin phosphorylation and the crossbridge cycle in arterial smooth muscle. **Science**, v. 211, p. 495-497, 1981.
- DJUKANOVIC, R.; WILSON, J.W.; BRITTEN, K.M. Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control



subjects using immunohistochemistry. **American Review of Respiratory Diseases** v. 142, p. 863-71, 1990.

DUBRAVCC, D.B., SPRIGGS, D.R., MANNICK, J.A., RODRICK, M.L. Circulating Human Peripheral Blood Granulocytes Synthesize and Secrete Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 6758-6761, 1990.

DWEIK, R.A., COMHAIR, S.A., GASTON, B. NO chemical events in the human airway during the immediate and late antigen-induced asthmatic response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 2622-2627, 2001.

EDWARD, S.W., HUGHES, V., BARLOW, J., BUCKNALL, R. Immunological detection of MPO in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Biochemical Journal**, v. 250, p. 81-5, 1988.

EDWARDS, G., WESTON, A.H. Effect of potassium channel modulating drugs on isolated smooth muscle, In: **Handbook of Experimental Pharmacology** (Szekeres, L. and Papi J.G., v. 111, eds) Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1994, p. 469-532.

EDWARDS, M.J., KELLER, B.J., KAUFFMAN, F.C., THURMAN, R.G. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 119, p. 275-279, 1993.

EISERICH, J.P., BALDUS, S., BRENNAN, M.L., MA, W., ZHANG, C., TOUSSON, A., CASTRO, L., LUSIS, A.J., NAUSEEF, W.M., WHITE, C.R., FREEMAN, B.A. Myeloperoxidase, a Leukocyte-Derived Vascular NO Oxidase. **Science**, v. 296, p. 2391-2394, 2002.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 82, p. 70-77, 1959.

ESCRIG, V., ÚBEDA, A., FERRÁNDIZ, M.L., DARIAS, J., SÁNCHEZ, J.M., ALCARAZ, M.J., PAYA, M. Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, p. 123-131, 1997.

FANTONE, J.C., WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **American Journal of Pathology**, v. 107, p. 395-418, 1982.

FAURSHOU, P. Toxic hepatitis due to benzo-pyrone. **Human Toxicology**, v. 1, p.149-150, 1982.

FERNANDES, D.J., RICHARD, W.M., LAKSER, O., DOWELL, M., STEWART, A.G., SOLWAY, J. Airway hyperresponsiveness: From molecules to bedside. Invited Review: Do inflammatory mediators influence the contribution of airway smooth muscle contraction to airway hyperresponsiveness in asthma? **Journal of Applied Physiology**, v. 95, p. 844-853, 2003.

- FERRÁNDIZ, M.L., ALCARAZ, M.J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**. v. 32, p.283-288, 1991.
- FEUER G. The metabolism and biological actions of coumarins. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 10, p.85-158, 1974.
- FIEDLER, T.J., DAVEY, C.A., FENNA, R.E. X-ray crystal structure and characterization of halide-binding sites of human myeloperoxidase at 1.8 Å resolution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 11964-11971, 2000.
- FISH, J.E., ANKIN, M.G., KELLY, J.F., PETERMAN, V.I. Regulation of bronchomotor tone by lung inflation in asthmatic and nonasthmatic subjects. **Journal of Applied Physiology**, v. 50, p. 1079-1086, 1981.
- FLOHE L, OTTING F. Superoxide dismutase assays. **Methods in Enzymology**. v.105, p.93-104, 1984.
- FOLKERTS, G., NIJKAMP, F.P. Airway epithelium: more than just a barrier. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, p. 334-341, 1998.
- FOOK, J.M.S.L.L., MACEDO, L.L.P., MOURA, G.E.D.D., TEIXEIRA, F.M. A serine proteinase inhibitor isolated from Tamarindus indica seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sciences**, v. 76, p. 2881-2891, 2005.
- FORMICA, J.V., REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.
- FRANKEL, E.N., HUANG, S.W., AESCHBACH, R., PRIOR, E. Antioxidant activity of rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in water emulsion. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 131-135, 1996.
- FU, X., KAO, J.L., BERGT, C., KASSIM, S.Y., HUQ, N.P., D'AVIGNON, A., PARKS, W.C., MECHAM, R.P., HEINECKE, J.W. Oxidative Cross-linking of Tryptophan to Glycine Restrains Matrix Metalloproteinase Activity: Specific Structural Motifs Control Protein Oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 6209-6212, 2004.
- FUJIE, K., SHINGUH, Y., INAMURA, N., YASUMITSU, R., OKUHARA, M. Release of neutrophil elastase and its role in tissue injury in acute inflammation: effect of the elastase inhibitor, FR 134043. **European Journal Pharmacology**, v. 374, p. 117-125, 1999.
- FUJISAWA, T. Role of oxygen radicals on bronchial asthma. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 505-509, 2005.
- FUJITA, J., NELSON, N.L., DAUGHTON, D.M., DOBRY, C.A., SPURZEM, J.R. Evaluation of elastase and anti-elastase balance in patients with chronic bronchitis and pulmonary emphysema. **American Review of Respiratory Disease**, v. 142, p. 57-62, 1990.
- GALATO, K., CKLESS, M.F., SUSIN, C., GIACOMELLI, R.M., RIBEIRO-DO-VALLE, A., SPIN, A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. **Redox Report**, v. 6, p. 243-250, 2001.

GALLEANO, M., PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1271, p. 321-326, 1995.

GALVEZ, A., GIMENEZ-GALLEGO, G., REUBEN, J.P., ROY-CONTANCIN, L., FEIGENBAUM, P., KACZOROWSKI, G.J., GARCIA, M.L. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 11083-90, 1990.

GAMSÉ, R., HOLZER, P., LEMBECK, F. Decrease of substance P in primary afferent neurons and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. **British Journal of Pharmacology**, v. 68, p. 207-213, 1980.

GANGOLLI, S.D., SHILLING, W.H., GRASSO, P., GAUNT, I.F. Studies on the metabolism and hepatotoxicity of coumarin in the baboon. **Biochemical Society Transactions**, v. 2, p.310-312, 1974.

GANZERA, M., ELMERER-MÜLLER, E.P., STUPPNER, H. Cycloartane triterpenes from *Combretum quadrangulare*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 835-838, 1998.

GAO, Z., HUANG, K., XU, H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria balcalensis* Georgii against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 173-178, 2001.

GARCIA LEME, J., HAMAMURA, L., LEITE, M.P., ROCHA E SILVEIRA, M. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rat's paw by local injection of carragenin and by heating. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 88-96, 1973.

GARTNER, B.C., SEIFERT, C.B., MICHALK, D.V., ROTH, B. Phenprocoumon therapy during pregnancy: case report and comparison of the teratogenic risk of different coumarin derivatives. **Zeitschrift für Geburtshilfe Perinatologie**, v. 197, p. 262-265, 1993.

GILBERT, H.F., MC LEAN, V.M. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GIMENEZ, A., ESTEVEZ, T., IRAHOLA, P., VELASCO, P., Conservación ambiental a través de la valoración etnobotánica y etnofarmacológica en Bolivia. **Revista Boliviana de Química**, v. 13, p. 35-48, 1996.

GOETZL, E.J., AN, S., SMITH, W.L. Specificity of expresión and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 1051-1058, 1995.

GONZALEZ-AMARO, R., SANCHEZ-MADRID, F. Cell adhesion molecules: selectins and integrins. **Critical Reviews in Immunology**, v. 19, p. 389-429, 1999.

GOPALAKRISHNAN, M., BUCKNER, S.A., SHIEH, C-C., FEY, T., FABIYI, A., CARROLL, W.A., SULLIVAN, J.P., COGHLAN, M.J., BRUNE, M.E. In vitro and in vivo

characterization of a novel naphthylamide ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opener, A-151892. **British Journal of Pharmacology**, v. 143, p. 81-90, 2004.

GOECKA, A., AKSOY, M.O., HARTSHORNE, D.J. The effect of phosphorylation of gizzard myosin on actin activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 71, p. 325-331, 1974.

GRIBKOFF, V.K., LUM-RAGAN, J.T., BOISSARD, C.G., POST-MUNSON, D.J., MEANWELL, N.A., STARRETT, J.E., KOZLOWSKI, E.S., ROMINE, J.L., TROJNACKI, J.T., MCKAY, M.C., ZHONG, J., DWORETZKY, S.I. Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. **Molecular Pharmacology**, v. 50, p. 206-217, 1996.

GRIENGLING, K.K., SORESCU, D., LASSEGUE, B., USHIO-FUKAI, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, p. 2175-2183, 2000.

GROSSMAN, N. Inhibitory effects of phloretin on histamine release from isolated rat mast cells. **Agents Actions**, v.25, p. 284-290, 1988.

GUAY, J., BATEMAN, K., GORDON, R., MANCINI, J., RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 24866-72, 2004.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Koogan S.A., 2002. p. 82; 369

HADDAD, J.J., HARB, H.L. L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s) **Molecular Immunology**, v. 42, p. 987-1014, 2005.

HALL, I.P. Second messengers, ion channels and pharmacology of airway smooth muscle contraction. **European Respiratory Journal**, v. 15, p. 1120-1127, 2000.

HALLIWELL, B. The role of oxygen radicals in human disease with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v.23 (suppl 1), p. 118-26, 1993.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**, New York: Oxford University Press, 1999.

HAMPTON, M.B., KETTLE, A.J. WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.

HAN, S., ZHOU, V., PAN, S., LIU, Y., HORNSBY, M., McMULLAN, D., GRAY, N., CALDWELL, J., GU, X.J. Identification of coumarin derivatives as a novel class of allosteric MEK1 inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 15, p. 5467-5473, 2005.

HARBELL, J.W., KOONTZ, S.W., LEWIS, R.W., LOVELL, D., ACOSTA, D. Cell cytotoxic assays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 79-126, 1997.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution, and function of plant flavonoids. In: **Plant HARGREAVE, F.E.** et al. Allergen-induced airway responses and relationships with nonspecific airway reactivity. In: HARGREAVE FE (ed) **Airway Reactivity**. Astra, Mississauga, ON, 1980. p. 145-150.

HARRIS, E.S., MCINTYRE, T.M., PRESCOTT, S.M., ZIMMERMAN, G.A. The leukocyte integrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 23409-12, 2000.

HARRYS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R. Prostaglandins as modulators of immunity. **TRENDS in Pharmacology**, v. 23, p. 144-150, 2002.

HARTLEY, D.P., KOLAJA, K.L., REINCHORD, J., PETERSON, D.R. 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 161, p. 23-33, 1999.

HASSELMARK, L., MALMGREN, R., ZETTERSTRÖM, O., UNGE, G. Selenium supplementation in intrinsic asthma. **Allergy**, v. 48, p. 30-6, 1993.

HATANAKA, K., KAWAMURA, M., OGINO, K., MATSUO, S., HARADA, Y. Expression and function of cyclooxygenase-2 in mesothelial cells during late phase of rat carrageenan-induced pleurisy. **Life Sciences**, v. 65, p. 161-166, 1999.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32. p. 1141-1148, 1983.

HEBBEL, R.P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability, **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 401-4, 1986.

HEIJNEN, C.G.M., HAENEN, G.R.M.M., MINOU, O.R., STALPERS, E.M. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure-activity relationship revisited. **Free Radical Research**, v. 36, p. 575-581, 2002.

HENRICKS, P.A., NIJKAMP, F.P. reactive oxygen species as mediators in asthma. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, p. 409-420, 2001.

HENSLEY, K., ROBINSON, K.A., GABBITA, S.P., SALSMAN, S., FLOYD, R.A. Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1456-1462, 2000.

HERMANN, A., ERXLEBEN, C. Charybdotoxin selectively blocks small Ca-activated K channels in Aplysia neurons. **The Journal of General Physiology**, v. 90, p. 27-47, 1989.

HERNANDEZ, V., RECIO, M.C., MÁNEZ, S., PRIETRO, J.M., GINER, R.M., RIOS, J.L. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. **Planta Medica**, v. 67, p. 726-731, 2001.

HIBBS, M.S., BAINTON, D.F. Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules. **Journal of Clinical Investigation**, p. 1395-402, 1989.

HILKENS, C.M. SNIJDERS, A., SNIJDEWINT, F.G., WIERENGA, E.A., KAPSENBERG, M.L. Modulation of T-cell cytokines secretion by accessory-cell-derived products. **The European Respiratory Journal. Supplement.**, v. 22, p. 90s-94s, 1996.

HISADA, T., YOSHIHISA, K., TSUNEAKI, S. Properties of membrane current from guinea-pig trachea. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 416, p. 151-161, 1990.

HOLGATE, S.T. Asthma: a dynamic disease of inflammation and repair. In: **The rising trends in asthma**, 1997. 5 p.

HOLGATE, S.T. Inflammatory and structural changes in the airways of patients with asthma. **Respiratory Medicine**, v. 94 (Suppl):S3-6, 2000.

HOLGATE, S.T., PETERS-GOLDEN, M., PANETTIERI, R.A., HENDERSON, W.R. Roles of cysteinyl leucotrienes in airway inflammation, smooth muscle function and remodeling. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. S18-S34, 2003.

HOLROYDE, M.C. The influence of epithelium on the responsiveness of guinea-pig isolated trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 87, p. 501-507, 1986.

HOLZER, P. Local effector function of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

HOMMES, D.W., PEPPELENBOSCH, M.P., VAN DEVENTER, S.J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. **Gut**, v. 52, 144-151, 2003.

HORVATH, I., DONNELLY, L.E., KISS, A., PAREDI, P., KHARITONOV, S.A., BARNES, P.J. Raised levels of exhaled carbon monoxide are associated with an increased expression of heme oxygenase-1 in airway macrophages in asthma: a new marker of oxidative stress. **Thorax**, v. 53, p. 668-72, 1998.

HOULT JRS, PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology**, v. 27, p. 713-722, 1996.

HUONG, N.T.T., MATSUMOTO, K., KASAI, R., YAMASAKI, K., WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese Ginseng saponin and its constituents. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n.9, p. 978-981, 1998.

HWANG, T.L., WU, C.C., TENG, C.M. YC-1 potentiates nitric oxide-induced relaxation in guinea-pig trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 577-584, 1999.

HYNES, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell**, v. 110, p. 673-687, 2002.

ICHINOSE, M., BARNES, P.J. A potassium channel activator modulates both excitatory noncholinergic and cholinergic neurotransmission in guinea-pig airways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic**, v. 252, p. 1207-1212, 1990.

IRWIN, C.G.; BIOLEAU, R.; TREMBLAY, J.; MARTIN, R.R.; MACKLEM, P.T. Bronchodilatation: non-cholinergic, noadrenergic mediation demonstrated in vivo in the cat. **Science**, v. 207, p. 791-792, 1980.

JANSEN, N.J., VAN OEVEREN W., VAN VLIET, M., STOUTENBEEK, C.P., EVSMAN, L., WILDEVUUR, C.R. The role different types of corticosteroids on the inflammatory mediators in cardiopulmonary bypass. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 5, p. 211-217, 1991.

JOLLOW, D. Glutathione thresholds in reactive metabolite toxicity. **Archives of Toxicology. Supplement**, v. 3, p. 95-110, 1980.

JONES, G.E. cellular signaling in macrophage migration and chemotaxis. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 68, p. 593-602, 2000.

JONES, T.R., CHARETTE, L., GARCIA, M.L., KACZOROWSKI, G.J. Selective inhibition of relaxation of guinea pig trachea by charybdotoxin, a potent  $Ca^{++}$ -activated  $K^{+}$  channel inhibitor. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, p. 697-706, 1990.

JOOS, G.F., PAUWELS, R.A. Tachykinins receptor antagonists: potential in airways diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 235-241, 2001.

JORDAN, J.E., ZHAO, Z.Q., VINTEN-JOHANSEN, J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**. v. 43, p. 860-78, 1999.

KAMAL, A.M., CORRIGAN, C.J., TETLEY, T.D., ALAGHBAND-ZADEH, J., SMITH, S.F. Effect of fluticasone on the elastase:anti-elastase profile of the normal lung. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 713-719, 2002.

KAMINSKY, D.A., MITCHELL, J., CARROL, N. Nitrotyrosine formation in the airway and lung parenchyma of patients with asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 747-754, 1999.

KASAMA, T., KOBAYASHI, K., YAJIMA, N., SHIOZAWA, F., YODA, Y., TAKUCHI, T.T., MORI, Y., NEGISHI, M., IDE, H., ADACHI, M. Expression of vascular endothelial growth factor by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis (RA). **Clinical & Experimental Immunology**. v. 121, p. 533-538, 2000.

KASAMA, T., MIWA, Y., ISOZAKI, T., ODAI, T., ADACHI, M., KUNKEL, S.L. Neutrophil-derived cytokine: potential therapeutic targets in inflammation. **Current Drug Targets**. v. 4, p. 273-279, 2005.

KASAMA, T., STRICTER, R.M., LUCKACS, N.V., BURDICK, M.D., KUNKEL, S.L. Interferon gamma modulates the expression of neutrophil-derived chemokines. **Journal of Investigative Medicine**. v. 43, p. 58-67, 1995.

KATO, M., MORIKAWA, A., KIMURA, H., SHIMIZU, T., NAKANO, M., KUROUME, T. Effects of antiasthma drugs on superoxide anion generation from human polymorphonuclear leukocytes or hypoxanthine-xanthine oxidase system. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**, v. 96, p. 128-33, 1991.

KATSUKI, S., MURAD, F. Regulation of adenosine cyclic 3'-5'-monophosphate and guanosine cyclic 3'-5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. **Molecular Pharmacology**, v. 13, p. 330-341, 1997.

KEFFORD, J.F., CHANDLER, B.V. **The Chemical Constituents of Citrus Fruits**. New York: Academic Press, 1970.

KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C. Assay for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**. v. 233, p. 502-12, 1994.

KHARITONOV, S.A., BARNES, P.J. Biomarkers of some pulmonary disease in exhaled breath. **Biomarkers**, v. 7, p. 1-32, 2002.

KILLEEN, T.J. **Guia de arboles de Bolívia**. La Paz:Quipus S.R.L., 1993, p. 462.

KIPS, J.C.; O'CONNOR, B.J.; LANGLEY, S.J.; WOODCOCK, A.; KERSTJENS, HAM. Results of phase I trial with SCH55700, a humanized anti-IL-5 antibody in severe persistent asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. A505, 2000.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 111, p. 383-389, 1999.

KOLSET, S.O., GALLAGHER, J.T. Proteoglycans in haemopoietic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1032, p. 191-121, 1990.

KOTLIKOFF, M.I. Potassium currents in canine airway smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, v. 259, p. L384-L395, 1990.

KUBO, M., NAKAYA, Y., MATSUOKA, S., SAITO, K., KURODA, Y. 1993. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 74, p. 471-476, 1993.

KUBO, M., NAKAYA, Y., MATSUOKA, S., SAITO, K., KURODA, Y. Atrial natriuretic factor and isosorbide dinitrate modulate the gating of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in cultured vascular smooth muscle. **Circulation Research**, v. 74, p.471-476, 1993.

KUMAR, R.K. Understanding airway wall remodeling in asthma: a basis for improvements in therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91, p. 93-104, 2001.

KUMAR, V., ABBAS, A.K., FAUSTO, N. **Patologia – Bases Patológicas da Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUME, H., HALL, I.P., WASHABAU, R.J.  $\beta$ -adrenergic agonists regulate K<sub>Ca</sub> channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and independent mechanisms. **Journal of Clinical Investigation**, v. 93, p. 371-379, 1994.



KUME, H., TAKAI, A., TOKUNO, H., TOMITA, T. Regulation of Ca<sup>++</sup> dependent K<sup>+</sup>-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. **Nature**, v. 341, p. 152-154, 1989.

LABTEST DIAGNÓSTICA. Disponível em: <<http://www.labtest.com.br>>. Acesso em: 23 jan, 2006.

LAI, Z., GAN, X., WEI, L., ALLISTON, K.R. Potent inhibition of human leukocyte elastase by 1,2,5-thiadzolidium-3-one 1,1 dioxide-based sulfonamide derivatives. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 429, p. 191-197, 2004.

LAKE, B.G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity:relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 423-453, 1999.

LAPINCT, J.A., SCAPINI, P., CALZETTI, F., PEREZ, O., CASSATELLA, M.A. Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 6917-6923, 2000.

LARA M, ROSENBAUM S, RACHELEFSKY G, ET AL. Improving childhood asthma outcomes in the United States: a blueprint for policy action. **Pediatrics**, v. 109, p. 919-30, 2002.

LAU, D., MOLLNAU, H., EISERICH, J.P., FREEMAN, B.A., DAIBER, A., GEHLING, U.M., BRÜMMER, J., RUDOLPH, V., MÜNDEL, T., HEITZER, T., MEINERTZ, T., BALDUS, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 431-436, 2005.

LAW, K.W., NG, K.K., YUEN, K.N., HO, C.S. Detecting asthma and bronchial hyperresponsiveness in children. **Hong Kong Medical Journal**, v. 6, p.99-104, 2000.

LEAL, L.K.A.M. **Estudos farmacológicos do extrato hidroalcoólico e constituintes químicos de *Torresea cearensis* Fr. Allem.** 128 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, 1995.

LEAL, L.K.A.M., MATOS, M.E., MATOS, F.J.A., RIBEIRO, R.A., FERREIRA, F.V. AND VIANA, G.S.B. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, p.221-227, 1997.

LEAL, L.K.A.M., NECHIO, M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., FONTENELE, R.A., VIANA, G.S.B. Anti-inflammatory and Smooth Muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v.17, p.335-340, 2003b.

LEAL, L.K.A.M., NOBRE JÚNIOR, G.M.A., MORAES, M.O., PESSOA, C., OLIVEIRA, R.A., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., VIANA, G.S.B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 388, p. 86-90, 2005.

- LEAL, L.K.A.M., OLIVEIRA, F.G., FONTENELE, J.B., FERREIRA, M.A.D., VIANA, G.S.B. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003a.
- LEAL, L.K.A.M.; COSTA, K. C. S.; PEREIRA, F. A.; BASTOS, M.V.R.; CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E.R.; VIANA, G.S.B. Atividade antinociceptiva e antiedematogênica de *Amburana cearensis* (CUMARU), silvestre e cultivada, em camundongos – um estudo comparativo. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Manaus, AM, 2004.
- LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; A.A.G., BEZERRA, G.A., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151-159, 2000.
- LEE, S. R.; KWON, K. S.; KIM, S. R.; RHEE, S. G. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 15366–15372, 1998.
- LEE, L.Y., PISARRI, T.E. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. **Respiration Physiology**, v. 47-65, 2001.
- LEEUWENBURGH, C., JI, L.L. Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, p. 941-949, 1995.
- LEITE, E.J. State-of-knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. **Journal for Nature Conservation**, v. 13, p. 49-65, 2005.
- LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p. 868-874, 2002.
- LILJA, H.; BLANC, P.; DEMETRIOU, A.A.; ROZGA, J. Response of cultured fetal and adult rat hepatocytes to growth factors and cyclosporine. **Cell Transplantation**, v. 7, p. 257-266, 1998.
- LIN, H.; CASALE, T.B. Treatment of allergic asthma. **American Review of Respiratory Disease**, v. 16 (113 Suppl. 9A), p. 8S-16S, 2002.
- LINCOLN, T.M., CORNWELL, T.L. Towards an understanding of the mechanism of action of cyclic AMP and cyclic GMP in smooth muscle relaxation. **Blood Vessels**, v. 28, p. 129-137, 1991.
- LO, T.N., ALMEIDA, A.P., BEAVAN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indometacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 221, p. 261-267, 1982.
- LÓPEZ, J.A. **Árboles comunes del Paraguay**. Ñande Yvirá Mata Kuera, Cuerpo de Paz, Asunción, 1987.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil**. Ed. Plantarum, Nova Odessa, 1992. 360 p.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 298 p.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-271, 1951.

LUSCINSKAS, F. W. ET AL. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 14, p. 105, 2002.

MACPHERSON, J.C., COMHAIR, S.A., ERZURUM, S.C. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 5763-5772, 2001.

MADGE, L.A., PROBER, J.S. TNF signaling in vascular endothelial cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 70, p. 317-325, 2001.

MAJNO, G., PALACE, G.E. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 11, p. 571-605, 1961.

MAJOR, G.N., COLLIER, J.D. Repair of DNA lesion O<sup>6</sup>-methylguanine in hepatocellular carcinogenesis. **Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery**, v. 5, p. 355-366, 1998.

MALMGREM, R., UNGE, G., ZETTERSTRÖM, O., THEORELL, H., DE WAHL, K. Lowered glutathione-peroxidase activity in asthmatic patients with food and aspirin intolerance. **Allergy**, v. 41, p. 43-5, 1986.

MANTHEY, J.A. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. **Microcirculation**, v. 7, p. S29-S34, 2000.

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., INTRONA, M. Endothelial activation by cytokines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 832, p. 93-116, 1997.

MARQUEZ, L.A., DUNFORD, H.B. Kinetics of oxidation of tyrosine and dityrosine by myeloperoxidase compounds I and II. Implications for lipoprotein peroxidation studies. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 30434-40, 1995.

MATÉS, J.M., PÉREZ-GÓMEZ, C., BLANCA, M. Chemical and biological activity of free radical 'scavengers' in allergic diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 296, p. 1-15, 2000.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais- guia de seleção e emprego de plantas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 2<sup>a</sup> Ed. Fortaleza: Imprensa Universitária - UFC, 2000, p. 212-213.

MAUAD, T., SOUZA, A.S.L., SALDIVA, P.H.N., DOLHNIKOFF, M. Remodelamento brônquico na asma. **Journal de Pneumologia**, v. 26, p. 91-115, 2000.

MAYES, P.A. Biologic oxidation. In MURRAY R.K., GRANNER, D.K. MAYES, P.A., RODWELL, V.W. (eds): **Harper's Biochemistry**. San Mateo, Appleton & Lange, 1990, p. 105-11.

MC LAY, P. GIBSON, D., FONG, K., HORNBROOK, K. Effect of glutathione peroxidase activity on lipid peroxidation in biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 431, p. 459-468, 1976.

- MCCOLL, S.R., PAQUIN, R., MCNARD, C., BCAULICU, A.D., Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. **Journal of Experimental Medicine**. v. 176, p. 593-598, 1992.
- MCDA, L., GASPERINI, S., CCSKA, M., CASSATELLA, M.A., Modulation of Proinflammatory Cytokine Release from Human Polymorphonuclear Leukocytes by Gamma Interferon. **Cellular Immunology**. v. 157, p. 448, 1994.
- MCDONALD, D.M., THURSTON, G., BALUK, P. Endothelium gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**. v. 6, p. 7, 1999.
- MCEVER, R.P. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 14, p. 581-586, 2002.
- MCGARWEY, L.P.A., DUNBAR, K., MARTIN, S.L. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 1, p. 269-275, 2002.
- MEISTER, A., ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711-760, 1983.
- MELIN, A.M., PERROMAT, A., DELERIS, G. Pharmacologic application of Fourier transform IR spectroscopy: in vivo toxicity of carbon tetrachloride on rat liver. **Biopolymers**, v. 57, p. 160-168, 2000.
- MELLO FILHO, A.C., HOFFMAN, M.E., MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, p. 273-275, 1983.
- MELONI, F., BALLABIO, P., GORRINI, M., MARENA, C., MALANDRINO, S., LUISETTI, M. Effects of 39-hydroxyfarrerol (1dB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products. **Inflammation**, v. 19, p. 689-699. R219, 1995.
- METCHNIKOFF, E. **Immunity in infective disease**. New York, Johnson Reprint Corp. 1968.
- MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O., REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 7, 235-246, 1994.
- MIDDLETON JR., E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Review**, v. 52, p. 673-751, 2000.
- MIDWINTER, R.G., VISSERS, M.C., WINTERBOURN, C.C. Hypochlorous Acid Stimulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Enhances Cell Survival. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 394, p. 13-20, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Estatísticas de Mortalidade, 2000.

MIURA, M., YAMAUCHI, H., ICHINOSE, M., OHUCHI, Y., KAGEYAMA, N., TOMAKI, M., ENDOH, N., SHIRATO, K. Impairment of neural nitric oxide-mediated relaxation after antigen exposure in guinea-pig airways in vitro. **American Journal Respiratory Critical Care Medicine**, v. 156, p. 217-222, 1997.

MOHR, W., WESSINGHAGE, D. The relationship between polymorphonuclear granulocytes and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. **Zeitschrift fur Rheumatologie**, v. 37, p. 81-86, 1978.

MONCADA, S., HIGGS, E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, p. 361-374, 1991.

MORIMOTO, H., YAMASHITA, M., MATSUDA, A., MIYAKI, H., FUJII, T. Effects of FR 113680 and FK 224, novel tachykinin antagonists, on cigarette smoke-induced rat tracheal plasma extravasation. **European Journal Pharmacology**, v. 224, p. 1-5, 1992.

MORLEY, J. Potassium channels openers. In: Page CP, Metzger WJ, eds. **Drugs and the Lung**. New York: Raven Press, 1994, p. 383-396.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T., PEREIRA, N.A. **Medical plants of Brazil**. Reference publications, Inc. Alagonac, Michigan, 2000.

MORTON, L.W., CACCETA, R.A.A., PUDDEY, I.B. Chemistry and biological effects of dietary phenolics compounds: relevance to cardiovascular disease. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 27, p. 152-159, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**, v. 82, p. 521-534, 2002.

MURAI, M., MORIMOTO, H., MACEDA, Y., FUJII, T. Effects of the tripeptide substance P antagonist, FR 113680, on airway constriction and airway edema induced by neurokinins in guinea pigs. **European Journal Pharmacology**, v. 217, p. 23-27, 1992.

MURPHY, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Immunology**. v. 12, p. 593-633, 1994.

NADEL, J.A. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies. **Chest**, v.117, p.386-389, 2000.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY, A., CIRINO, M., METTERS, K.M., CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**, v. 128, p. 853-859, 1999.

NATHAN, C., SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NATHAN, C.F. Points of control in inflammation. **Nature**. V. 420, p. 846-852 2002.

NAUSEEF, W.M., MALECH, H.L. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. **Blood**, v. 69, p.1504-1507, 1986.

NAZARUK, J., JAKONIUK, P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 208-212, 2005.

NAZARUK, J., JAKONIUK, P. Flavonoid composition and antimicrobial activity of *Cirsium rivulare* (Jacq.) All. flowers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 208-212, 2005.

NÉNAN, S., BOICHOT, E., LAGENTE, V., BERTRAND, C. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 (Suppl I), p. 167, p. 167-172, 2005.

NICK, J.A., AVDI, N.J., YOUNG, S.K., KNALL, C., GERWINS, P., JOHNSON, G.L., WORTHEN, G.S. Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activating factor and fMLP. **Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 975-986, 1997.

NIELSON-KUDSK, J. E. Potassium channel modulation: a new drug principle for regulation of smooth muscle contractility. Studies on isolated airways and arteries. **Danish Medical Bulletin**, v. 43, p. 429-447, 1996.

NISHI, Y., BOSWELL, V., ANSARI, T., PIPRAWALA, F. Elastase-induced changes in lung functions: relationship to morphometry and effect of drugs. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 16, p. 221-229, 2003.

O'DONNELL, S.R.; SARR, N. Histochemical localization of adrenergic nerves in the guinea pig trachea. **British Journal of Pharmacology**, v. 47, p. 707-710, 1973.

OGASAWA, H., FUJITANI, T., DRZEWIECKI, G., MIDDLETON, JR. E. The role of hydrogen peroxide in basophil histamine release and the effect of selected flavonoids. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 78, p. 321-8, 1986.

OKADA, Y., YANAGISAWA, T., TAIRA, N. BRL38227 (levcromakalim)-induced hyperpolarization reduces the sensitivity of  $Ca^{++}$  of contractile elements in canine coronary artery. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 347, p. 438-444, 1993.

OWEN, C.A., CAMPBELL, M.A., BOUKEDES, S.S., CAMPBELL, E.J. Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. **American Journal of Physiology**, v. 272, p. 385-393, 1997.

PAREDI, P., KHARITONOV, S.A., LOUKIDES, S., PANTELIDIS, P., DU-BOIS, R.M., BARNES, P.J. Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. **Chest**, v. 115, p. 1352-6, 1999.

PARINANDI, N.L., KLEINBERG, M.A., USATYUK, P.V., CUMMINGS, R.J., PENNATHUR, A., CARDOUNEL, A.J. Hyperoxia-induced NAD(P)H oxidase activation and regulation by MAP kinases in human lung endothelial cells. **American Journal of Physiology. Lung Cell Molecular Physiology**, v. 284, p. L26-38, 1999.

PARTRICK, D.A., MOORE, E.E., OFFNER, P.J., MELDRUN, D.R., TAMURA, D.Y., JOHNSON, J.L., SILLIMAN, C.C. Maximal human neutrophil priming for superoxide production and elastase release requires p38 mitogen-activated protein kinase activation. **Archives of Surgery**, v. 135, p. 219-225, 2000.

PATHAK, D., PATHAK, K., SINGLA, A.K. Flavonoids as medicinal agents – recent advances. **Fitoterapia**, v. 117, p. 371-389, 1991.

PATTEMORE, P.K., ASHER, H.I., HARRISON, A.C., MITCHELL, E.A., REA, H.H., STEWARD, A.W. The interrelationship among bronchial hyperresponsiveness, the diagnosis of asthma and asthma symptoms. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 142, p. 549-554, 1990.

PAYA, M., HALLIWEL, B., HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 205-14, 1992.

PEDRO, A.J., SIQUEIRA, M.C., SILVA, M., SILVA, Z., FONTES, G., GARD-BRITO, B., RAMALHO, F., CARNEIRO DE MOURA, M. Mieloperoxidase com marcador de *stress* oxidativo na cirrose hepática. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 10, p. 209-214, 2003.

PELAIA, G., GALLELLI, L., VATRELLA, A., GREMBIALE, R.D., MASELLI, R., DE SARRO, G.B., MARSICO, S.A. Potential role of potassium channel openers in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Life Sciences**, v. 70, p. 977 – 990, 2002.

PENDRY, I.D. Neuronal control of airway smooth muscle. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 57, p. 171-202, 1993.

PETERS, S.P.; ZANGRILLI, J.G.; FISH, J.E. Late phase allergic reactions. In: Middleton Jr. E.; REED, C.F.; ELLIS, E.F.; ADKINSON JR., N.F. editors. 5<sup>th</sup> ed. **Allergy: principles and practice**, vol. 1. St. Louis: Mosby-Year Book; 1998. 342-55 p.

PETERSON, J.W.; EVANS, R.J.C.; PRIME, F.J. Selectivity of bronchodilator action of salbutamol in asthmatic patients. **British Journal of Diseases of the Chest**. v.65, p. 21-38, 1971.

PHIPPS, R.P., STEIN, S.H., ROPER, R.L. A new view of prostaglandin-E regulation of the immune response. **Immunology Today**, v. 12, p. 349-352, 1991.

PILLER, N.B. The ineffectiveness of coumarin treatment on thermal oedema of macrophage-free rats. **British Journal of Experimental Pathology**. v. 57, p. 170-178, 1976.

PISTELLI, L., BERTOLI, A., GIACHI, I., MANUNTA, A. Flavonoids from *Genista ephedroids*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1404-1406, 1999.

PITHON CURI, T.C., DE MELO, M.P., PALANCH, A.C., MIYASAKA, C.K., CURI, R. Percentage of phagocytosis, production of O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and NO, and antioxidant enzyme activities of rat neutrophils in culture. **Cell Biochemistry and Function**, v. 16, p. 43-9, 1998.

- PIZZALE, L., BORTOLOMEAZZI, R., VICHI, S. ÜBEREGGER, E., CONTE, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 82, p. 1645-1651, 2002.
- POSADAS, I., BUCCI, M., ROVIEZZO, F., ROSSI, A., PARENTE, L., SAUTEBIN, L., CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.
- PRIOR, R.L., CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 1173-1181, 1999.
- QUAST, U. Do the K<sup>+</sup> channel openers relax smooth muscle by opening K<sup>+</sup> channels? **Trends In Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 332-337, 1993.
- QUIRON, R. Natural antioxidants and neurodegenerative diseases. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 3447-52, 2004.
- RAHMAN, I., MORRISON, D., DONALDSON, K., MACNEE, W. RECKMAGE, R.O., GLENDE, E.A., DOLAK, J.A., WALLER, R.L. Mechanism of carbon tetrachloride toxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 43, p. 139-154, 1989.
- RHODES, M.J.C. Physiological roles for secondary metabolites in plants: from progress, many outstanding problems. **Plant Molecular Biology**, v. 24, p. 1-20, 1994.
- RICHARDSON, J.B.; BOUCHARD, T. Demonstration of a nonadrenergic inhibitory nervous system in the trachea of the guinea pig. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 56, p. 473-480, 1975.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Rogers, J.L. (Ed), **Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Protein and Nucleic Acids**, v. 5. Academic Press, New York, p. 259-305, 1991.
- RINCON, A.R., COVARRUBIAS, A., PEDRAZA-CHAVERRI, G., POO, J.L., ARMENDARIZ-BORUNDA, J., PANDURO, A. Differential effect on CCl<sub>4</sub> on renal function in cirrhotic and non-cirrhotic rats. **Experimental and Toxicological Pathology**, v. 51, p. 199-205, 1999.
- RISSE, A. Leukocyte antimicrobial peptides: multifunctional effector molecules of innate immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, p. 785, 2000.
- ROHRDANZ, E., KAHL, R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, p. 27-38, 1998.
- RÖSCH, D., BERGMANN, M., KNORR, D., KROH, L.W. Structure-antioxidant efficiency relationship of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 4233-4239, 2003.



ROSSI, D., ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 217-242, 2000.

ROTONDO, S., RAJTAR, G., MANARINI, S., CELARDO, A., ROTILIO, D., GAETANO, G., EVANGELISTA, V., CERLETTI, C. Effect of trans-reveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. **British Journal of Pharmacology**, v. 123, p. 1691-1699, 1998.

SAEIDNIA S, GOHARI AR, ITO M, KIUCHI F, HONDA G. Bioactive constituents from *Dracocephalum subcapitatum* (O. Kuntze) Lipsky. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60, p. 22-4, 2005.

SAKAMAKI, K., TOMONAGA, M., TSUKUI, K., NAGATA, S. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 16828-16836, 1989.

SALA, A., RECIO, M.C., SCHINELLA, G.R., MÁÑEZ, S., GINER, R.M., CERDÁ-NICOLÁS, M., RÍOS, J-L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SALEH, D., ERNST, P., LIM, S. Increased formation of the potent oxidant peroxynitrite in the airways of asthmatic patients is associated with induction of nitric oxide synthase: effect of inhaled glucocorticoid. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 929-937, 1998.

SALVEMINI, D., CUZZOCREA, S. Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 3, p. 886-895, 2002.

SALVEMINI, D., ISCHIROPOULOS, H., CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. **Inflammation Protocols**, v. 225, p. 291-304, 2003.

SAMPAIO, I.L., LEAL, L.K.A.M., VIANA, G.S.B., MORAES, M.O., MORAES, M.E.A. Toxicologia clínica do xarope de cumaru (fitoterápico)-estudo piloto com 12 voluntários. In: **XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, PE, 2000.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000, p.331.

SANZGIR, U.Y., SRIVATSON, V., MURALIDHARA, S., DALLAS, C.E., BRUCKNER, J.V. Uptake, distribution and elimination of carbon tetrachloride in rats tissues following inhalation and ingestion exposures. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 134, p. 120-129, 1997.

SARTOR, L., PEZZATO, E., DELLÁICA, I., CANIATO, R., BIGGIN, S., GARBISA, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 229-237, 2002.

SCHENKEL, E.P, GOSMANN, G., PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.

SCHOONBROODTH, S., LEGRAND-POELS, S., BEST-BELPOMME, M., PIETTE, Activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. **Biochemical Journal**, v. 321, p. 777-785, 1997.

SCOTT, M.D., LUBIN, B.H., ZUO, L., KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.24, p.192-205,1968.  
SEGAL, A.W. How neutrophil kill microbes. **Annual Review Immunology**, v. 23, p. 197-223, 2005.

SEGAL, A.W., JONES, O.T. The subcelular distribution and some properties of the cytochrome b component of the microbicidal oxidase system of the human neutrophils. **Biochemical Journal**. v. 182, p. 181-88, 1979.

SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 145-150, 2002.

SEIDL, P.R. Prospects for Brazilian Natural Products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, p. 239-247, 1999.

SENGELOV, H., KJELDSSEN, L., KROEZE, W., BERGER, M., BORREGAARD, N. Secretory vesicles are the intracellular reservoir of complement receptor 1 in human neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 804-10, 1994.

SHAN, X., AW, T.Y., JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHIGEKI, A., MASAYUKI, I. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in pathogenesis of liver injury. **Journal of Hepato-biliary-Pancreatic Surgery**, v. 7, p. 40-48, 1999.

SHILLING, W.H., CRAMPTON, R.F., LONGLAND, R.C. Metabolism of coumarin in man. **Nature**, v. 221, p. 664-665, 1969.

SHOWELL, H.J., NACCACHE, P.H., WALENGA, R.W., DALECKI, M., FEINSTEIN, M.B., BECKER, E.L. The effects of quercetin, 1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone, cytochalasin A and nordihydrogualaretic acid on lysosomal enzyme secretion, arachidonic acid metabolism and Ca<sup>2+</sup> fluxes in rabbit neutrophils. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 30, p. 167-181, 1981.

SIEDLE, B., GUSTAVSSON, L., JOHANSSON, S., MURILLO, R., CASTRO, V., BOHLIN, L., MERFORT, I. The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 897-903, 2003.

SILVA FILHO, J., LEAL, L.K.A.M., VIANA, G.S.B. Parâmetros farmacognósticos dos xaropes de cumaru, guaco e chambá produzidos em Fortaleza. In: **XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, Recife, PE, 2000.

SILVA, S.R., BUITRÓN, X., OLIVEIRA, L.H., MARTINS, M.V.M. Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Pesquisa financiada pelo Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha e pelo Ibama, 2001.

SIMIBE, M.M., BANNI, S., ANGIÓN, E., CORTA, G., DE MIGEIO, W.M.R., MURONI, M.R., FEO, F. 5-Methyl thioadenosine administration prevents lipid peroxidation and fibrogenesis induced in rat liver by carbon tetrachloride intoxication. **Journal of Hepatology**, v. 34, p. 386-394, 2001.

SING, R., PATHAK, D.N. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, and glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl<sub>3</sub>-induced epileptogenic foci in the rat brain. **Epilepsia**, v. 31, p. 15-26, 1990.

SKERGET, M., KOTNIK, P., HADOLIN, M., HRAS, A.R., SIMONIC, M., KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, p. 191-198, 2005.

SKLOOT, G., PERMUTT, S., TOGIAS, A. Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 2393-2403, 1995.

SMITH, R.M., CURNUTTE, J.T. Molecular basis of chronic granulomatous disease. **Blood**, v. 77, p. 673-686, 1991.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA - III Consenso brasileiro no manejo da asma. **Jornal de Pneumologia**, v.28 (Supl. 1), 2002.

SOLWAY, J.; LEFF, A.R. Sensory neuropeptides and airway function. **Journal of Applied Physiology**, v. 71, p. 2077-2087, 1991.

SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 159, p. 129-145, 1968.

SOUSA, M.P., MATOS, M.E.O., MATOS, F.J.A. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Impr. Universitária/UFC, Fortaleza, 1991, p. 416.

SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., MELLO, R., FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 17, p. 377-380, 1988.

SPICUZZA, L., BASILE, L., BELVISI, M.G., BELLOFIORE, S., MATERA, M.G. The protective role of epithelium-derived nitric oxide in isolated bovine trachea. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 357-362, 2002.

SPISANI, S., BREVEGLIERI, A., FABBRI, E., VERTUANI, G., RIZZUTO, O., CAVICCHIONI, G. Modification of the amide bond at position 3 in fMLP analogs select neutrophil functions. **Peptide Research**, v. 9, p. 279-282, 1996a.

- SPISANI, S., PARESCHI, M.C., BUZZI, M., COLAMUSSI, M.L., BIONDI, C., TRANIELLO, S., PAGANI ZECCHINI, G., PAGLIALUNG PARADISI, M., TORRINI, I., FERRETTI, M.E. Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. **Cell Signal**, v. 8, p. 269-277, 1996b.
- STEPHENS, N.L. Airway smooth muscle. **Lung**, v. 179, p. 333-373, 2002.
- STERK, P. Virus-induced airway hyperresponsiveness. **The European Respiratory Journal**, v. 6, p. 894-902, 1993.
- STOCKLEV, R.A. Chronic bronchitis: the antiproteinase/proteinase balance and the effect of infection and corticosteroids. **Clinics in Chest Medicine**, v. 9, p. 643-656, 1988.
- STOCKLEY, R.A., HILL, A.T., HILL, S.L., CAMPBELL, E.J. Bronchial inflammation, its relationship to colonizing microbial and  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency. **Chest**, v. 117, p. 2915-2935, 2000.
- STRETTON, D., MIURA, M., BELVISI, M.G., BARNES, P.J. Calcium-activated potassium channels mediate prejunctional inhibition of peripheral sensory nerves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 1325-1329, 1992.
- STRICTER, R.M., KASAHARA, K., ALLEN, R., SHOWELL, H.J., STANDIFORD, T.J., KUNKEL, S.L. Human neutrophils exhibit disparate chemotactic factor gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, p. 725-730, 1990.
- STRUWE, F.E., REINWEIN, H., STIER, R. Coumarin embryopathy. **Radiology**, v. 74, p. 68-71, 1984.
- SU, S.B., GONG, W., GAO, J.L., SHEN, W., MURPHY, P.M., OPPENHEIM, J.J., WANG, J.M. A seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor: on the size of the hydrophobic pocket corresponding to residue 2 of the tripeptide. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 395-402, 1999.
- SUFFREDINI, A.F. New insight into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, p. 203, 1999.
- SUNDARESAN, M.; YU, Z. X.; FERRANS, V. J.; IRANI, K.; FINKEL, T. SVOBODOVÁ, A., PSOTOVÁ, J., WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A Review. **Biomedical Papers**, v. 147, p. 137-145, 2003.
- TAICHMAN, N.S., YOUNG, S., CRUCHLEY, A.T., TAYLOR, P., PALCOLOG, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, p. 397-400, 1997.
- TAKEMURA, O.S., BANNO, Y., NOZAWA, Y. Inhibition of N-formylmethionyl-leucylphenylalanine-stimulated tyrosine phosphorylation and phospholipase D activation by quercetin in rabbit neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1503-1510, 1997.
- TANAKA, A.S., M.U. SAMPAIO, S. MARANGONI, B. DE OLIVEIRA, J.C. NOVELLO, M.L. OLIVA, E. FINK AND C.A. SAMPAIO. Purification and primary structure

determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Journal of Biological Chemistry**. v. 378, p. 273-81, 1997.

TANAKA, A.S., SAMPAIO, M.U., MARANGONI, S., DE OLIVEIRA, B., NOVELLO, J.C., OLIVA, M.L., FINK, E., SAMPAIO, C.A. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 378, p.273-81, 1997.

TOMLINSON, A., APPLETON, I., MOOREGILROY, A.R., WILLIS, D., MITCHELL, J.A., WILLOUGHBY, A. Cyclo-oxygenase and nitric oxide isoforms in rat carrageenan-induced pleurisy. **British Journal Pharmacology**, v. 113, p. 693-698, 1994.

TREVISAN, M. T. S., MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301-304, 2003.

TRONCOSO, M.F., ZOLEZZI, P.C., HELLMAN, U. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 411, p. 93-104, 2003.

ÚBEDA, A., FERRÁNDIZ, M.L., HERENCIA, F. Activación celular: desgranulación leucocitaria. In:ALCARAZ, M.J., CALIXTO, J.B., DELGADO, R. **Técnicas *in vitro* para el estudio de fármacos antiinflamatorio**. CYTED - Subprograma X Proyecto X.6. Espanha, 2002.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annual Review of Immunology**. v. 20, p. 825-853, 2002.

VAALI, K., LI, L., LÄHTEENMÄKI, T., VAPAATALO, H. Role of BK(Ca) channels and cyclic nucleotides in synergistic relaxation of trachea. **European Journal of Pharmacology**, v. 399, p. 75-84, 2000.

VAALI, K., LIANG, L., ILARI, P., HEIKKI, V. Relaxing effects of NO donors on guinea pig trachea in vitro are mediated by calcium-sensitive potassium channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 286, p. 110-114, 1998.

VAN DALEN, C.J., WHITEHOUSE, M., WINTERBOURN, C.C., KETTLE, A.J. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. **Biochemical Journal**, v. 327, p. 487-492, 1997.

VAN DER VLIET, A., EISERICH, J.P., HALLIWELL, B., CROSS, C.E. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite: A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. **Journal of Biological Chemical**. v. 272, p. 7617-7625, 1997.

VAN ROSUM JM. Cumulative dose-response curves. II. Technique for making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drug parameters. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v.143, p. 299-330, 1963.

VARNER, A.E.; LEMANSKE JR, R.F. The early and late response to allergen. In: BUSSE, W.W.; HOLGATE, S.T. editors. **Asthma and rhinitis**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackwell; 2000. 1172-85 p.

- VÁZQUEZ, J., FEIGENBAUM, P., KING, V.F., KACZOWSKI, G.J., GARCIA, M.L. Characterization of the high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 15564-71, 1990.
- VIGNOLA AM, CHANEZ P, CHIAPPARA G., GAGLIARDO, R. BONSIGNORE, G. Growth factors in the remodeling of asthma. **ACI International**, v. 10, p. 49, 1998.
- VILE, G.F., ROTHWELL, L.A., KETTLE, A.J. Hypochlorous Acid Activates the Tumor Suppressor Protein p53 in Cultured Human Skin Fibroblasts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 359, p. 51-56, 1998.
- VISSER, L., BLOUDET, E. R. The use of p-nitrophenyl N-tert-butyloxycarbonyl-L-alanine as substrate for elastase. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v.268, p.257-260, 1972.
- WANG Y, HAMBURGER M, GUEHO J, HOSTETTMAM K. Antimicrobial flavonoids from *Psidia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2323-2327, 1989.
- WANG, P., WU, P., ANTHES, J.C., SICGEL, M.J., EGAN, R.W., BILLAH, M.M. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. **Blood**. v. 83, p. 2678-2683, 1994.
- WANG, Y., HAMBURGER, M., GUEHO, J., HOSTETTMANN, K. Antimicrobial flavonoids from *Psidia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2323-2327, 1989.
- WARDMAN, P., CANDEIAS, L.P. Fenton chemistry: an introduction. **Radiation Research**, v. 145, p. 523-531, 1996.
- WCI, S., BLANCHARD, D.K., LIU, J.H., LEONARD, W.J., DJCU, J.Y. Activation of tumor necrosis factor-alpha production from human neutrophils by IL-2 via IL-2-R beta. **Journal of Immunology**, v. 150, p. 1979-1987, 1993.
- WEBB, R.C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**. v. 27, p. 201-206, 2003.
- WEISS, J., FRANSON, R.C., BECKERDITE, S., SCHMEIDLER, K., ELSBACH, P. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 55, p. 33-42, 1975.
- WEISSMAN, G. Inflammation: historical perspectives. In: Gallin J. L. et al. (Eds): **Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates**. New York: raven Press, 1992, p. 5.
- WILLIAMS, A.J., LEE, T.E. COCHRANE, G.M. Attenuation of nocturnal asthma by cromakalim. **Lancet**, v. 336, p. 334-336, 1990.
- WINTER, C.A, RISELY, E.A., NUSS, G.W. Carragenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WITKO-SARSAT, V., RIEU, P., DESCAMPS-LATSCHA, B., LESAVRE, P., HALBWACHS-MECARELLI, L. **Laboratory Investigation**, v.80, p. 617-653, 2000.

WU, B-N., LIN, R-J., LO, Y-C., SHEN, K-P., WANG, C-C., LIN, Y-T., CHEN, I-J. KMUP-1, a xanthine derivative, induces relaxation of guinea-pig isolated trachea: role of the epithelium, cyclic nucleotides and K<sup>+</sup> channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 1105-1114, 2004.

WU, Q., FU, D-X., HOU, A-J., LEI, G-Q., LIU, Z-J. Antioxidative phenols and phenolics glycosides from *Curruligo orchioides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, p. 1065-1067, 2005.

WU, W., SAMOSZUK, M.K., COMHAIR, S.A. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 1455-1463, 2000.

YOKOZAWA, T., SATO, A., CHO, E.J. Ginsenoside-Rd attenuates oxidative damage related to aging in senescence-accelerated mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 107-113, 2004.

ZHANG, L., MAIORINO, M., ROVERI, A., URSINI, F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1006, p. 140-143, 1989.

ZIPPRICH, K., CANZLER, E., HUNDSDORFER, S. Teratogenic effect of coumarins. **Zentralblatt für Gynäkologie**, v. 109, p. 364-368, 1987.

ZUANAZZI, J.A.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., DE MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000, p. 489-517.

# PUBLICAÇÕES

---





## 8. PUBLICAÇÕES

LEAL, L.K.A.M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B. Overview of chemical, toxicological and pharmacological studies of *Amburana cearensis* A C Smith and its active constituents. **Recent Progress in Medicinal Plants**, v. 11, p. 333-354, 2006.

LEAL, L.K.A.M., COSTA, M.F., PITOMBEIRA, M., BARROSO, V.M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., VIANA, G.S.B. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, 2005 (*in press*)

LEAL, L.K.A.M., NOBRE JÚNIOR, G.M.A., MORAES, M.O., PESSOA, C., OLIVEIRA, R.A., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., VIANA, G.S.B. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 388, p. 86-90, 2005.

LEAL, L.K.A.M., NECHIO, M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., FONTENELE, R.A., VIANA, G.S.B. Anti-inflammatory and Smooth Muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v.17, p.335-340, 2003.

LEAL, L.K.A.M., OLIVEIRA, F.G., FONTENELE, J.B., FERREIRA, M.A.D., VIANA, G.S.B. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003.

LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; A.A.G., BEZERRA, G.A., MATOS, F.J.A., VIANA, G.S.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p. 151-159, 2000.

## 8.2. PREMIAÇÕES

CERTIFICADO DE HONRA AO MÉRITO (FeSBE)

FONSECA, F. N., FONSECA, K. S., BARBOSA, A. L. R., CANUTO, K. M., SILVEIRA, E. R., LEAL, L. K. A. M., VIANA, G. S. B. Atividade antiinflamatória do amburosídeo A, um glucosídeo isolado de *Amburana cearensis* (CUMARU). In: XX Reunião Anual da FeSBE, Águas de Lindóia / SP, 2005.

MENÇÃO HONROSA - Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS

LEAL, L.K.A.M., NECHIO, M., SILVEIRA, E.R., CANUTO, K.M., FONTENELE, J.B., RIBEIRO, R.A., VIANA, G.S.B.

Categoria: trabalho publicado - “Anti-inflammatory and smooth muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith”.

Brasília, 2003.

PRÊMIO JOSÉ PEDRO DE ARAUJO - 2000

Trabalho: Estudo toxicológico e farmacológico pré-clínico de *Amburana cearensis* A. C. Smith (cumaru)”

Fundação José Pedro de Araújo, Belo Horizonte, 2000.

