

C 684.694  
R 1400690  
04/06/01  
R\$ 11,30

Universidade Federal do Ceará

Faculdade de Medicina

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia

**ESTUDO DE EFEITOS TÓXICOS E ATIVIDADES  
FARMACOLÓGICAS DA FRAÇÃO  
QUINONA DE *Auxemma oncocalyx* Taub.**

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R	1400690
04	106 1000

**Maria Augusta Drago Ferreira**

OK

Tese apresentada à Coordenação do Curso de  
Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade  
Federal do Ceará, para obtenção do título  
de Doutor em Farmacologia

**Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana**

**Fortaleza  
2001**

615.323  
7/11/2001  
2001  
11-2

F 442e Ferreira, Maria Augusta Drago

Estudo de efeitos tóxicos e atividades farmacológicas da fração quinona de *Auxemma oncocalyx* Taub./ Maria Augusta Drago Ferreira. - Fortaleza, 2001.

226f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana  
Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. *Auxemma oncocalyx* - efeitos farmacológicos.
2. *Auxemma oncocalyx* - efeitos farmacológicos. I. Título.

CDD 615.323

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

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição

Maria Augusta Drago Ferreira

Data da Defesa: 23/02/2001

Banca Examinadora:

Profa.Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

Profa.Dra. Sílvia Berlanga de Moraes Barros

Prof.Dr. Antônio Flávio Midio

Prof.Dr. Vietla Satyanarayana Rao

Profa.Dra. Helena Lutércia Luna Coelho

*À minha mãe*

*Maria Aparecida,  
por me proporcionar tudo que se espera de uma mãe.*

*Ao meu filho*

*André,  
por aceitar e compreender as ausências e ser  
a razão e estímulo para seguir adiante.*



## **AGRADECIMENTOS**

*Em especial, à Profa. Dra Glauce Socorro de Barros Viana, pela preciosa orientação, confiança e apoio na execução deste trabalho;*

*Ao Prof. Dr. Antonio Flávio Midio, pela presença e incentivo constantes em todas as etapas da minha vida profissional;*

*Aos colegas do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará pela compreensão e colaboração durante meu afastamento;*

*Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, nas pessoas das Profas Dra. Aparecida Yoshiko Hoshikawa Fujimura e Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros e a todo pessoal do Laboratório de Patologia, pela cordial acolhida e valiosa colaboração na realização de parte desse trabalho;*

*Ao Osmar Del Rio Holanda Nunes, meu companheiro de trabalho, pelo carinho e dedicação;*

*À Maria Vilani Rodrigues Bastos e Ana Eclésia Moura Rodrigues, pela amizade e imprescindível auxílio técnico;*

*À Miriam Parente Monteiro, amiga sempre presente, por tudo;*

*Ao amigo Nilberto Robson Falcão do Nascimento, pela inestimável contribuição em muitos momentos;*

*À Maria Jania Teixeira pela atenção e enorme contribuição nos estudos histopatológicos;*

*À Suely Maia Ponte, pela amizade, dedicação e arte na apresentação escrita do trabalho;*

*Ao Pedro Jorge Caldas Magalhães, Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos e Manoel Cláudio Azevedo Patrocínio pela generosa contribuição na apresentação oral do trabalho;*

*À Danielle Silveira Macedo, Geanne Matos de Andrade Cunha, Juvenia Bezerra Fontenele, Letícia Veras Costa Lotufo e Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, pela amizade, interesse e colaboração;*

*A todos os demais, que fazem o Laboratório de Neurofarmacologia, pelo convívio amigável e préstimos;*

*Ao Laboratório Central do Hospital Universitário da Universidade Federal do Ceará, particularmente à Dra. Zilmar Fontenele e Silva e ao Newton Cesar Wayne Cunha, pela colaboração na realização dos exames hematológicos e bioquímicos do sangue dos animais;*

*À Norma Carvalho Linhares e funcionários da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará; pela ordenação das referências bibliográficas;*

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

*A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Ensina-me senhor, os momentos exatos do trabalho e do descanso,  
da prece e do gesto concreto. A hora de pescar e a hora de secar as redes.  
A coragem para agir, atuar. E a conformidade para aceitar o que  
não posso mudar. Que eu tenha a rapidez da ação quando as circunstâncias  
o pedem. E a paciência dos frutos que sabem esperar na vigília  
da maturação. Que tua graça seja presente em minha vida,  
no tempo que passa, prefácio da eternidade.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Plantas como fontes de fármacos.....	23
1.2 <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub.: considerações gerais.....	24
1.3 Plaquetas e sua ativação.....	28
1.4 Inibidores da função plaquetária.....	33
1.5 Radicais livres e “espécies de oxigênio reativas”.....	38
1.6 Defesas antioxidantes.....	41
1.7 Estresse oxidativo e inflamação.....	43
<b>2 OBJETIVOS</b>	
2.1 Geral.....	49
2.2 Específicos.....	49
<b>3 MATERIAL</b>	
3.1 Fração quinona de <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub.....	51
3.2 Sangue humano.....	51
3.3 Animais.....	51
3.4 Reagentes, soluções e outros.....	51
3.5 Equipamentos.....	54
<b>4 MÉTODOS</b>	
4.1 Obtenção da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	56
4.2 Avaliação da toxicidade aguda e de efeitos comportamentais da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> em camundongos.....	59

4.3	Determinação da atividade inibitória da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas <i>in vitro</i> .....	60
4.3.1	Colheita do sangue.....	60
4.3.2	Obtenção de plasma rico em plaquetas.....	60
4.3.3	Teste de agregação plaquetária em PRP.....	61
4.3.4	Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP.....	61
4.3.5	Determinação da concentração inibitória 50% da fração quinona para diferentes agonistas.....	62
4.3.6	Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela fração quinona.....	63
4.3.7	Avaliação das plaquetas quanto a sua capacidade de agregar novamente após a inibição pela fração quinona.....	63
4.3.8	Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária.....	65
4.3.9	Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da pentoxifilina sobre a agregação plaquetária.....	66
4.3.10	Determinação da ação da fração quinona sobre a inibição da agregação plaquetária causada pela L-arginina.....	66
4.4	Determinação da atividade inibitória da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de ratos <i>in vitro</i> .....	67
4.4.1	Colheita do sangue.....	67
4.4.2	Obtenção do “pool” de plasma rico em plaquetas.....	67
4.4.3	Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP.....	68
4.5	Determinação da atividade da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> administrada pela via intraperitoneal sobre a agregação de plaquetas em ratos.....	68
4.6	Avaliação da administração oral por tempo prolongado da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação plaquetária e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue em ratos.....	69
4.7	Determinação da atividade da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre o tempo de sangramento em camundongos.....	70
4.7.1	Após a administração intraperitoneal.....	70
4.7.2	Após a administração oral.....	71

4.8	Determinação do número de plaquetas em sangue total após a administração intraperitoneal da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> em camundongos.....	71
4.9	Determinação do efeito da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre musculatura lisa vascular.....	71
4.10	Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de <i>A. oncocalyx in vitro</i> .....	72
4.10.1	Obtenção do homogeneizado de cérebro de rato.....	72
4.10.2	Determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico.....	73
4.10.3	Medida de quimiluminescência.....	74
4.11	Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de <i>A. oncocalyx in vivo</i> .....	75
4.11.1	Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em rato.....	75
4.11.2	Prolongamento por CCl <sub>4</sub> do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	77
4.12	Determinação da atividade antiedematogênica da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	78
4.12.1	Modelo de edema de pata induzido por carragenina em rato.....	78
4.12.2	Modelo de edema de pata induzido por dextrano em rato.....	79
4.13	Determinação da atividade antinociceptiva da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	79
4.13.1	Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	79
4.13.2	Teste da formalina.....	80
4.13.3	Teste da placa quente.....	81

## 5 RESULTADO

5.1	Obtenção da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	83
5.2	Avaliação da toxicidade aguda e de efeitos comportamentais da fração quinona <i>A. oncocalyx</i> em camundongos.....	83
5.3	Determinação da atividade inibitória da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas <i>in vitro</i> .....	87

5.3.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP.....	87
5.3.2 Determinação da concentração inibitória 50% da fração quinona para diferentes agonistas.....	100
5.3.3 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela fração quinona.....	106
5.3.4 Avaliação das plaquetas quanto a sua capacidade de agregar novamente após a inibição pela fração quinona.....	106
5.3.5 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária.....	108
5.3.6 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da pentoxifilina sobre a agregação plaquetária.....	108
5.3.7 Determinação da ação da fração quinona sobre a inibição da agregação plaquetária causada pela L-arginina.....	112
5.4 Determinação da atividade inibitória da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de rato <i>in vitro</i> .....	116
5.4.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP.....	116
5.5 Determinação da atividade da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> administrada pela via intraperitoneal sobre a agregação de plaquetas em ratos.....	122
5.6 Avaliação do efeito da administração oral por tempo prolongado da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a agregação plaquetária e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue em ratos.....	126
5.7 Determinação do efeito da fração quinona (FQ) de <i>A. oncocalyx</i> sobre o tempo de sangramento em camundongos.....	129
5.7.1 Após a administração intraperitoneal.....	129
5.7.2 Após a administração oral.....	131
5.8 Determinação do número de plaquetas em sangue total após a administração intraperitoneal da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> em camundongos.....	131
5.9 Determinação do efeito da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> sobre a musculatura lisa vascular.....	134
5.10 Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> <i>in vitro</i> .....	134

5.10.1	Determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico....	134
5.10.2	Medida de quimiluminescência.....	138
5.11	Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de <i>A. oncocalyx in vivo</i> .....	138
5.11.1	Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em rato.....	138
5.11.2	Prolongamento por CCl <sub>4</sub> do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	144
5.12	Determinação da atividade antiedematogênica da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	151
5.12.1	Modelo de edema de pata induzido por carragenina em rato.....	151
5.12.2	Modelo de edema de pata induzido por dextrano em rato.....	151
5.13	Determinação da atividade antinociceptiva da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> .....	157
5.13.1	Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	157
5.13.2	Teste da formalina.....	160
5.13.3	Teste da placa quente.....	163
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>166</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>198</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>201</b>



## LISTA DE FIGURAS

1 <i>Auxemma oncocalyx</i> Taub. (pau branco).....	25
2 Fórmula estrutural da oncocalixona A.....	27
3 Receptores de agregação plaquetária.....	30
4 O papel das “espécies de oxigênio reativas” na inflamação.....	46
5 Marcha esquemática de obtenção do extrato metanólico do cerne de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	57
6 Marcha esquemática de obtenção da fração hidrossolúvel, a partir do extrato metanólico do cerne de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	58
7 A (cromatograma da oncocalixona A) e B (cromatograma da fração hidrossolúvel de <i>Auxemma oncocalyx</i> ).....	84
8 Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	88
9 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).....	90
10 Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	91
11 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina (Tromb.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	94
12 Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	95
13 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno (Colág.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	97

14	Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	98
15	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	101
16	Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	102
17	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina (Adren.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	104
18	Gráfico representativo da restauração da capacidade de agregação de plaquetas humanas após a sua inibição pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> utilizando o ácido araquidônico (AA 285,7 µg/ml) como agonista.....	107
19	Gráfico representativo da restauração da capacidade de agregação de plaquetas humanas após a sua inibição pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> utilizando a trombina (3,04 U/ml) como agonista.....	107
20	Potencialização pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> da ação inibitória da aspirina (Asp.) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP). 110	110
21	Potencialização pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> da ação inibitória da pentoxifilina (PTX) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).....	113
22	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a inibição causada pela L-arginina (L-arg.) da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno (colág.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	115
23	Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas de rato induzida pelo ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) por diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	117
24	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).....	119

25	Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas de rato induzida pela trombina em plasma rico em plaquetas (PRP) por diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	120
26	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por trombina (Tromb.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	123
27	A (efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> em anéis de aorta de rato) e B (curva concentração-efeito representativa).....	135
28	Capacidade antioxidante (CAO) de diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> medida com base na inibição da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	137
29	Capacidade antioxidante de diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> medida com base na inibição da emissão de quimiluminescência.....	140
30	Cortes de fígado de rato corados com hematoxilina e eosina.....	143
31	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada pela via intraperitoneal sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	153
32	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada pela via oral sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	155
33	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos.....	158
34	Provável local de ação da fração quinona de <i>A. oncocalyx</i> no metabolismo oxidativo do ácido araquidônico em plaquetas.....	174

## LISTA DE TABELAS

1 Número de mortes causadas por diferentes doses da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	86
2 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).....	89
3 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP).....	92
4 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP).....	96
5 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	99
6 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina (Adren.) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	103
7 Valores de CI50 da fração quinona de <i>Auxemma oncocalyx</i> , na inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por diversos agonistas.....	105
8 Potencialização pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> da ação inibitória da aspirina sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP).....	109
9 Potencialização pela fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> da ação inibitória da pentoxifilina (PTX) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).....	111
10 Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a inibição causada pela L-arginina (L-arg.) da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP).....	114

11 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) <i>in vitro</i> .....	118
12 Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP), <i>in vitro</i> .....	121
13 Avaliação da resposta de plaquetas ao ADP, em plasma rico em plaquetas de ratos pré-tratados com a fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	124
14 Avaliação da resposta de plaquetas ao ADP, em plasma rico em plaquetas (PRP) de ratos pré-tratados com a fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> .....	125
15 Atividade da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre parâmetros hematológicos em ratos.....	127
16 Atividade da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre parâmetros bioquímicos em sangue de ratos.....	128
17 Efeito inibitório da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via intraperitoneal sobre o tempo de sangramento em camundongos.....	130
18 Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via oral sobre o tempo de sangramento em camundongos.....	132
19 Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre as plaquetas após administração intraperitoneal em camundongos.....	133
20 Capacidade antioxidante (CAO) da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> medida através da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	136
21 Capacidade antioxidante (CAO) da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> medida através da emissão de quimiluminescência (QL).....	139
22 Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre os níveis plasmáticos de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) em ratos, medidos 72 h após o tratamento com o tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ).....	141

23	Efeito da administração da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre os níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ).....	145
24	Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via intraperitoneal sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	146
25	Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via oral sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	147
26	Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via intraperitoneal sobre o prolongamento por tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ) do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	149
27	Efeito da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada por via oral sobre o prolongamento por tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ) do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	150
28	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada pela via intraperitoneal sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	152
29	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> administrada pela via oral sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	154
30	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos.....	156
31	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongo.....	159
32	Ação inibitória da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	161
33	Avaliação do envolvimento do sistema opióide no efeito da fração quinona de <i>Auxemma oncocalyx</i> sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	162
34	Ação da fração quinona (FQ) de <i>Auxemma oncocalyx</i> e morfina no teste da placa quente em camundongos.....	164

## RESUMO

A espécie *Auxemma oncocalyx* Taub. pertencente a família Boraginaceae é característica do sertão nordestino onde é conhecida como pau branco. As cascas dessa árvore são adstringentes e popularmente utilizadas no tratamento de cortes e feridas. O objetivo do presente trabalho foi o de estudar efeitos tóxicos e atividades farmacológicas da fração hidrossolúvel obtida do cerne (caule) de *A. oncocalyx*, constituída em cerca de 80% pela oncocalexona A (fração quinona). A DL50 da fração quinona (FQ) para camundongos, determinada pelo método dos probitos foi de 182,16 mg/kg, i.p. e acima de 500 mg/kg, v.o. A administração de FQ por 15 dias na dose de 50 mg/kg, v.o. a ratos não alterou parâmetros hematológicos ou bioquímicos do sangue. As atividades farmacológicas investigadas foram: antiagregante plaquetária, antioxidante, antiedematogênica e antinociceptiva, utilizando vários modelos experimentais. Os resultados mostraram que FQ apresenta potente atividade antiagregante plaquetária em plaquetas humanas *in vitro*, frente a diferentes agonistas (ADP, CI50 = 53,85 µg/ml; trombina, CI50 = 93,76 µg/ml; colágeno, CI50 = 56,57 µg/ml; ácido araquidônico, CI50 = 86,07 µg/ml e adrenalina, CI50 = 67,93 µg/ml). Esse efeito foi potencializado pela presença de aspirina (inibidor de ciclooxigenase), e de pentoxifilina (inibidor de fosfodiesterase de AMPc), porém não pela L-arginina (substrato para a síntese de óxido nítrico). O efeito antiagregante plaquetário da FQ foi observado também em plaquetas de rato *in vitro*, frente aos agonistas: ADP e trombina, porém não *ex vivo*. Ao contrário do esperado, a FQ diminuiu o tempo de sangramento e contraiu a musculatura lisa vascular (aorta de ratos). Potente atividade antioxidante de FQ foi também detectada através da inibição de lipoperoxidação em homogeneizados de cérebro de ratos *in vitro*, determinada pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS,  $Q_{1/2}$  = 1,64 µg/ml) e quimiluminescência (QL = 2,06 µg/ml). Contudo, a FQ exerceu uma fraca ação protetora no modelo de hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub> em ratos, determinada pelas atividades de ALT e AST, TBARS e observação histopatológica. A ação

hepatoprotetora de FQ manifestou-se de forma mais intensa no modelo de prolongamento pelo tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) do tempo de sono barbitúrico em camundongos. As atividades antinociceptiva e antiinflamatória de FQ foram também observadas nos testes de contorções abdominais pelo ácido acético e formalina em camundongos (atividade antinociceptiva) e de edema de pata induzido pela carragenina e dextrano em ratos (atividade antiedematogênica). A atividade antinociceptiva é dose-dependente, predominante periférica e independente do sistema opióide. Os resultados desse trabalho nos permitiram concluir que FQ apresenta atividades antiagregante plaquetária, antiinflamatória e antioxidante entre outras e provavelmente essas ações dependem pelo menos em parte de sua capacidade sequestradora de radicais livres.



## ABSTRACT

*Auxemma oncocalyx* Taub. belongs to the Boraginaceae family and is native from the northeastern caatings where is know as “pau branco”. The stem bark of the tree is adstringent and popularly used in the treatment of wounds. The objective of the present work was to study toxicological effects and pharmacological activities of the hydrosoluble fraction isolated from the heartwood of *A. oncocalyx*. This fraction presents around 80 % of oncocalyxone A (quinone fraction). The LD50 of the quinone fraction (QF) in mice determined by the probit method was 182.16 mg/kg, i.p. and above of 500 mg/kg, o.d. The administration of QF for 15 days at the dose of 50 mg/kg, o.d. in rats, did not alter hematological or blood biochemical parameters . The pharmacological activities investigated were antiaggregating platelet, antioxidant, antiaedematogenic and antinociceptive using several experimental models. Results showed that QF presents a potent antiaggregating platelet activity in human platelets *in vitro* with different agonists (ADP, IC50 = 53.85 µg/ml; thrombin, IC50 = 93.76 µg/ml; collagen, IC50 = 56.57 µg/ml; arachidonic acid, IC50 = 86.07 µg/ml e adrenaline IC50 = 67.93 µg/ml). The activity was potentiated by aspirin (cyclooxygenase inhibitor), pentoxifylline (methylxantine derivative and cAMP-dependent phosphodiesterase inhibitor), but not by L-arginine (NO precursor). The antiaggregating activity of QF was also observed in rat platelet *in vitro* in the presence of the following agonists: ADP and thrombin. However no activity was observed *ex vivo*. Surprisingly QF decreased bleeding time and contracted vascular smooth muscle (rat aorta). A potent antioxidant activity of QF was detected by inhibition of lipoperoxidation in rat brain homogenates, as determined by the production of substance reactive to the thiobarbituric acid (TBARS, Q<sub>1/2</sub> = 1.64 µg/ml) and chemiluminescence (Q<sub>1/2</sub> = 2.06 µg/ml). However QF exerted a week activity on the model of CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats as determined by measurement of ALT, AST activities and TBARS besides histopathological studies. The hepatoprotective effect of QF manifested itself more intensely in the model of prolongation by CCL<sub>4</sub> of

the barbiturate sleeping time in mice. Antinociceptive and antiedematogenic activities were also observed after QF administration, in the tests of abdominal contortion by acetic acid, formalin and hot-plate in mice (antinociceptive activity) and carrageenan and dextran-induced rat paw edema (antiedematogenic activity). The antinociceptive activity was dose-dependent, predominantly peripheric and independent of the opioid system. Results from the present work show that QF presents antiplatelet, antiinflammatory and antioxidant activities among others and these actions are probably dependent upon free radicals scavenger ability of QF.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas como fontes de fármacos

Desde a aurora da humanidade as plantas são utilizadas como fontes de agentes medicinais. Estima-se que 25 % de todos os fármacos em uso clínico atualmente, sejam diretamente ou indiretamente derivados de plantas superiores (Balandrin e cols., 1993; Donald Brown, 1994; Calixto, 2000).

Apesar dos grandes avanços observados na medicina em décadas recentes, as plantas ainda oferecem importante contribuição para o cuidado com a saúde. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, devido à pobreza e a falta de acesso à medicina moderna, aproximadamente 80 % da população mundial que vive em países em desenvolvimento, depende essencialmente de plantas para o cuidado primário da saúde. Isso evidencia a necessidade de estudos para a avaliação da segurança e eficácia de medicamentos tradicionais (Calixto, 2000).

Durante os últimos vinte anos, o interesse pelas plantas medicinais cresceu enormemente em todos os níveis da sociedade ocidental, desde o uso pelo público em geral de produtos vegetais para a automedicação e como cosméticos naturais, até a investigação científica de plantas por sua ação biológica em humanos. Isso, somado a necessidade de encontrar novas entidades químicas biologicamente ativas determinaram a mudança de atitude da indústria farmacêutica. Há quinze anos atrás, nenhuma das 250 empresas mais importantes, tinham programas de pesquisa envolvendo plantas superiores. Hoje, mais da metade delas tem esses programas (Donald Brown, 1994; Calixto, 2000).

As plantas medicinais existentes no mundo, são mais abundantes em países tropicais. Os químicos de produtos naturais e fitoquímicos reconhecem que espécies de plantas contém uma variedade espantosa de princípios ativos. Uma explicação para a enorme variedade química que reside na diversidade biológica das espécies de plantas tropicais consiste no fato de que em seu habitat, nas florestas tropicais, essas plantas tem crescido e sobrevivido sob intensa competição por recursos e nutrientes e tiveram que desenvolver uma grande multiplicidade de defesas, a maioria delas químicas, para

proteger-se de predadores mamíferos, insetos e de doenças causadas por vírus e fungos patogênicos. A biodiversidade das espécies de plantas de florestas tropicais e a variedade química encontrada em cada espécie, levam a concluir que as plantas tropicais são, talvez, a fonte mais valiosa de novas moléculas biologicamente ativas (Donald Brown, 1994).

Estima-se que existam 250.000 espécies de plantas florescentes no mundo. Menos de 10 % destas foram examinadas cientificamente por seu potencial na medicina. Acredita-se que 60.000 espécies serão extintas até o ano de 2050. Isso cria um sentimento de urgência com respeito a priorizar os estudos sérios de plantas medicinais (Donald Brown, 1994).

Embora seja a Amazônia, com sua soberba vegetação, o maior repositório de plantas medicinais conhecidas ou potencialmente utilizáveis, é possível encontrá-las em bom número em outras regiões do Brasil, inclusive no Nordeste (Matos, 1982). O laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina e grupos de pesquisa em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC) vêm desenvolvendo estudos em colaboração de plantas medicinais, especialmente as do Ceará.

## 1.2 *Auxemma oncocalyx* Taub.: considerações gerais

O gênero *Auxemma* (família Boraginaceae) é constituído somente por 2 espécies muito próximas: *A. oncocalyx* Taub. e *A. glazioviana* Taub., ambas conhecidas pela denominação popular de pau branco. São as árvores mais características do sertão nordestino por seu porte, onde ocorrem com maior frequência, embora sejam também encontradas nos pés de serras e em vários pontos da faixa litorânea. Suas copas são bastante ramificadas, com folhagens de coloração verde oliva a verde escuro. As flores são pequenas, brancas, perfumadas e dispostas em densas panículas terminais (**Figura 1**). Geralmente, a floração principia em março e a frutificação em junho, mas isso pode variar com o início da estação chuvosa; assim em





**FIGURA 1 - *Auxemma oncocalyx* Taub.(Pau branco)**

agosto ainda podem ser encontradas plantas com flores (Braga, 1976; Pessoa, 1994).

A madeira extraída dessas espécies tem cerne roxo escuro, é dura, resistente ao ataque de fungos e insetos, principalmente cupim, adequada para vigamentos, carpintaria, marcenaria, estacas e mourões, encontrando largo emprego na construção civil. Suas ramas constituem forragem sertaneja muito procurada pelo gado. As cascas são adstringentes e por isso usadas em banhos no tratamento de cortes e feridas (Braga, 1976; Pessoa, 1994).

A descrição botânica de *Auxemma oncocalyx* Taub., segundo Lima (1989), segue transcrita textualmente:

“Árvore de 6 a 8 metros ou, quando em condições favoráveis, 10 a 12 metros. Casca cinza, levemente castanha, ritidoma grosseiro apenas nos indivíduos idosos. Ramos novos verdes, lisos; lenticelas grandes, esparsas.

Folhas simples, dispostas helicoidalmente, pecíolo verde, glabro, 3,3 - 4,0 cm de comprimento. Limbo oval-elíptico, agudo, acuminado, 12,0 - 18,0 cm de comprimento x 5,0 - 8,0 cm de largura; bordo levemente ondulado e grosseiramente denteado no terço terminal; base aguda, às vezes assimétrica; face dorsal mais clara.

Inflorescência em cimeira irregular, 12,0 - 18,0 cm, terminando em tirsos curtos.

Flores sésseis a minuto-pediceladas, levemente perfumadas; cálice urceolado, oliváceo-castanho, piloso, 3,0 - 4,0 mm de comprimento; lacínios de 1,0 mm; corola alva infundibuliforme, 5-lobada, 1,2 - 1,3 cm, porção basal estreita, 3,0 mm; lacínios 0,5 - 0,6 cm, diâmetro 1,9 - 2,1 cm.

Após a fecundação o cálice persiste resultando acrescente, chegando a atingir 6,0 - 8,0 cm de comprimento, em forma de pequeno balão, com ângulos bem salientes.

Fruto drupáceo de mesocarpo fibroso-farináceo.

Por sua ampla adaptação e a boa qualidade de sua madeira é muito recomendável o plantio de *A. oncocalyx* em áreas não demasiadas secas das caatingas, fazendo-se necessários estudos preliminares para o bom êxito da cultura.”

Estudos químicos de *A. oncocalyx* resultaram no isolamento de vários compostos. A alantoína, obtida a partir do extrato hidroalcoólico da casca da árvore

(Pessoa e De Lemos, 1997) pode explicar o relatado uso popular dessa parte da planta, auxiliar na cicatrização de cortes e feridas (Braga, 1976).

Do extrato hidroalcolico do lenho foram isolados: o sitosterol, seu glicosídeo, 3- $\beta$ -D-glicopiranosilsterol e sete quinonas terpenoídicas inéditas, dentre estas a oncoalexona A. (Pessoa e cols., 1993; Pessoa e cols., 1995). Para a identificação desse composto, Pessoa (1994) utilizou os seguintes técnicas: espectrometria de massa, espectrometria na região do infravermelho e espectrometria de ressonância nuclear magnética (RNM) de hidrogênio e  $C^{13}$ . A oncoalexona A, com fórmula molecular  $C_{17}H_{18}O_5$  e formula estrutural apresentada a seguir (Figura 2), foi definida como *rel*-8 $\alpha$ -hidroxi-5-hidroximetil-2-metoxi-8 $\alpha\beta$ -metil-7,8,8 $\alpha$ ,9-tetrahydro-1,4-antracendiona. Trata-se de um sólido amorfo, de cor vinho escuro, peso molecular 302 e ponto de ebulição 207,1 - 208,7 °C.

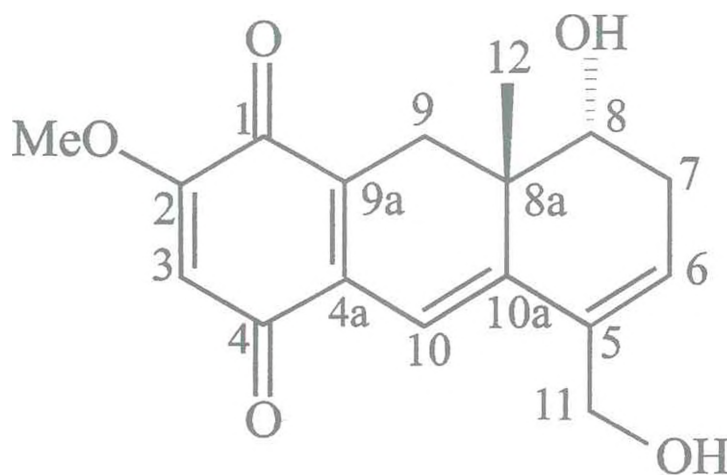


FIGURA 2 - Fórmula estrutural da oncoalexona A

Estudos farmacológicos anteriores relataram que o extrato hidroalcolico do lenho de *A. oncoalexona* apresentou as seguintes atividades: antiagregante plaquetária (Fontenele e Sousa, 1992), antitumoral (Pessoa e cols., 1992), analgésica e antiinflamatória (Lino e cols., 1996). Recentemente, estudos *in vitro* demonstraram a atividade antitumoral de oncoalexona A e de outra quinona isolada de *A. oncoalexona*, a oncoalexona C, (Pessoa e cols., 2000; Leyva e cols., 2000)



O grupo de pesquisa em química Orgânica da UFC, coordenado pelas professoras Telma Leda Gomes de Lemos e Otilia Desdenia Loiola Pessoa, colocou o extrato metanólico do cerne de *A. oncocalyx* a nossa disposição. Este, rico em quinonas, serviu para a obtenção de oncocalixona A.

Com base na literatura revisada, quinonas são biologicamente muito ativas. Várias atividades têm sido atribuídas a esses compostos, tais como: antiagregante plaquetária, (Teng e cols., 1993; Chung e cols., 1994), antioxidante (Belisário e cols., 1992, Houghton e cols., 1995; Tripathi e cols., 1995; Mori e cols., 1998), antiinflamatória (Kuo e cols., 1995; Vazquez e cols., 1996; Odukoya e cols., 1999), analgésica (Hernández - Pérez e cols., 1995; Abdel e cols., 2000), antitumoral (Morello e cols., 1995; Itoigawa e cols., 2000), antifúngica (Perry e cols., 1991; Gafner e cols., 1996) antimalárica (Figueiredo e cols., 1998) leishmanicida (Sauvain e cols., 1993; Sittie e cols., 1999) e outras.

Esses fatos despertaram nosso interesse pelo estudo do extrato metanólico do cerne de *A. oncocalyx*, a partir do qual foi obtida a fração constituída em sua maior parte (cerca de 80 %) pela oncocalixona A (fração quinona), cujas ações antiagregante plaquetária, antioxidante, antiedematogênica e analgésica foram investigadas.

Tendo em vista essas ações, cabe discorrer a seguir sobre plaquetas, sua ativação e inibição, caracterizar os radicais livres e defesas antioxidantes mais importantes e finalmente estabelecer a relação entre estresse oxidativo e inflamação.

### 1.3 Plaquetas e sua ativação

As plaquetas, discos biconvexos com aproximadamente 2 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, geradas por fragmentação do citoplasma de megacariócitos na medula óssea, circulam normalmente na corrente sanguínea. No sangue periférico humano, o número desses corpos anucleados é cerca de 200.000 a 300.000  $\mu\text{l}^{-1}$ . Seu tempo de vida usualmente varia de 7 a 10 dias e são retiradas da circulação pelo sistema reticuloendotelial ou por incorporação em tampões hemostáticos (Brüne e cols., 1991).

Plaquetas *in vivo* atuam principalmente na manutenção da circulação normal do sangue, preservando a integridade vascular e controlando a hemorragia após um certo dano no vaso (Ruggeri, 1994).

Um grande grupo de compostos endógenos, quimicamente heterogêneos, que inclui o fator de von Willebrand, colágeno, trombina, endoperóxidos de prostaglandina, tromboxano A<sub>2</sub>, adenosina difosfato, adrenalina, e fator ativador de plaquetas (PAF), são capazes de induzir a agregação plaquetária (**Figura 3**). Uma vez que plaquetas são muito sensíveis e podem rapidamente responder a esses agentes, sua atividade requer rigoroso controle, o que envolve a ação de inibidores endógenos, dentre os quais destacam-se em importância a prostaciclina e o óxido nítrico (Kroll e Schafer, 1989; Herman, 1998).

Após a ativação, as plaquetas exibem diferentes respostas que podem ser estudadas separadamente *in vitro*, mas que estão intimamente ligadas durante o processo de hemostasia *in vivo*. São elas: a adesão com alteração da forma, agregação e secreção (Barrie e cols., 1990).

A primeira resposta das plaquetas ao dano vascular é a sua adesão irreversível à superfície de revestimento interno da parede alterada do vaso. A adesão, provavelmente, precede e é necessária para a ativação da plaqueta. A habilidade da plaqueta de detectar o local de lesão deve-se a sua ligação com substratos expostos apenas nesse local. Vários componentes subendoteliais, inclusive diferentes tipos de colágeno, fibronectina e fator von Willebrand, podem atuar como substratos apropriados à adesão, cada qual reconhecido por receptor específico presente na superfície da plaqueta. Outro substrato de adesão potencial é o fibrinogênio, que embora não seja uma proteína subendotelial nativa, pode rapidamente ser retido no local do dano, por adsorção como tal ou por deposição do seu derivado insolúvel, fibrina (Ruggeri, 1994; Lefkovits, 1995).

Após a ativação, a plaqueta modifica sua forma de discóide para esferóide e emite pseudópodos. A mudança de forma, devido a contração do citoesqueleto, está

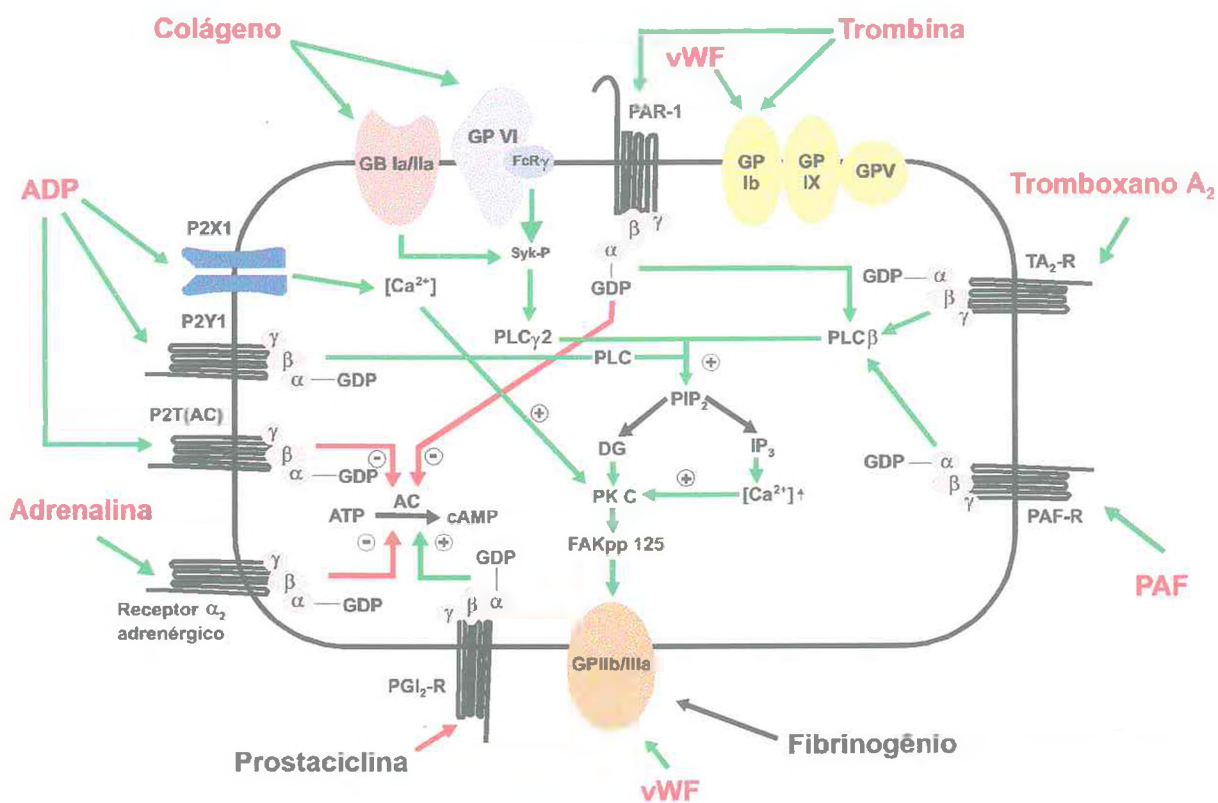


FIGURA 3 - Receptores de agregação plaquetária (Anke e Fabian, 1999).

associada a centralização de grânulos alfa, densos e lisossomais e parece ser pré-requisito para a secreção. A formação de pseudópodos facilita o contato das plaquetas entre si, o que é essencial para a agregação plaquetária (Siess, 1989).

O processo que resulta na formação do coágulo capaz de estancar a hemorragia envolve necessariamente a interação de plaquetas entre si (agregação), que ocorre após a adesão inicial de plaquetas no local de lesão vascular (Ruggeri, 1994).

Comum a todos os agentes agregantes endógenos é a sua ligação com receptores específicos na superfície da plaqueta (**Figura 3**). A transdução, através da membrana, do sinal emitido pela ativação do receptor, é feita por proteínas G, proteínas reguladoras de ligação ao nucleotídeo guanina (Siess, 1989; Kroll e Schafer, 1989; Brass e cols., 1993). Esses mecanismos de transdução estimulam e regulam sistemas efetores específicos, tais como a hidrólise de fosfolípido inositol induzida pela fosfolipase C e canais iônicos. A hidrólise de fosfolípido inositol, via fosfolipase C, modula os níveis dos mensageiros intracelulares: 1,4,5-trifosfato inositol (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> libera cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do sistema tubular denso da plaqueta, contribuindo para o aumento da concentração do cátion no citoplasma e DAG, por sua vez, ativa a proteína cinase C (PKC). A mobilização de Ca<sup>2+</sup> e a ativação de PKC juntos estimulam de modo sinérgico, diversas respostas da plaqueta inclusive a liberação de ácido araquidônico de estoques de fosfolípidos de membrana e a reação de secreção (Siess, 1989; Kroll e Schafer, 1989; Herman, 1998).

A exposição do receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), um receptor da classe das integrinas, presente na superfície da plaqueta, depende do aumento da concentração de Ca<sup>2+</sup> no citoplasma e é essencial para a agregação. Isso ocorre quando a plaqueta adquire a forma esférica com resultante alteração da conformação do receptor, tornando-o receptivo. A ligação de moléculas de fibrinogênio com os receptores GPIIb/IIIa forma pontes entre plaquetas adjacentes e possibilita a agregação (Lefkovits e cols., 1995; Herman, 1998).

Dois tipos de agregação, mencionados a seguir, são observados *in vitro*. A agregação primária, reversível, que ocorre sem a reação de liberação e pode estar relacionada a funções fisiológicas das plaquetas, ainda não esclarecidas. A agregação

secundária irreversível está associada a função hemostática das plaquetas e é consequência da reação de liberação. Esta compreende a liberação do ácido araquidônico e a produção de seus metabólitos, especialmente endoperóxidos de prostaglandina e tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) e a subsequente resposta de secreção plaquetária (Siess, 1989).

Nas plaquetas humanas, a hidrólise de fosfolipídeos de membrana, com liberação do ácido araquidônico, depende principalmente da ativação de fosfolipase  $A_2$  (Kroll e Schafer, 1989; McNicol e Shibou, 1998). Uma vez livre, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias. Uma delas compreende a ação da enzima 12-lipoxigenase sobre o ácido araquidônico, com formação de 12-hidroperoxiácido eicosatetranoico (12-HPETE), que é rapidamente convertido em 12-hidroxiácido eicosatetranoico (12-HETE). Esses dois compostos são agentes quimiotáticos para polimorfonucleares. A outra via que resulta na formação de  $TXA_2$  envolve a atuação das enzimas ciclooxigenase e tromboxano sintase. Inicialmente, a produção de endoperóxidos de prostaglandina ( $PGG_2$  e  $PGH_2$ ), a partir do ácido araquidônico, é catalizada pela ciclooxigenase. Em seguida, a tromboxano sintase promove a conversão desses intermediários instáveis em  $TXA_2$  (Brüne e cols., 1991). O  $TXA_2$  produz vasoconstrição local e induz a reação de secreção que leva a agregação secundária. Trata-se de um composto muito instável, que rapidamente transforma-se em  $TXB_2$ , metabólito biologicamente inativo (Fitzgerald, 1991).

A secreção da plaqueta, mediada pela produção de  $TXA_2$ , consiste na liberação do conteúdo de grânulos alfa, grânulos densos e do lisossomo. Os grânulos alfa contêm muitas proteínas, inclusive o fibrinogênio, fator von Willebrand, fibronectina, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator plaquetário-4 e beta-tromboglobulina. Os grânulos densos tem como constituintes o ADP, ATP e cálcio ( $Ca^{2+}$ ). Nos lisossomos estão presentes hidrolases ácidas, tais como beta-glicuronidase, N-acetil-glicosaminidase, catepsina e outras enzimas (Vermylen e cols., 1983).

A rápida formação de grandes agregados requer mecanismos de amplificação eficientes que compreendem a formação de  $TXA_2$  e secreção de ADP. Estes quando alcançam o espaço extracelular, durante a reação de liberação, ligam-se a receptores



específicos na superfície de plaquetas e induzem a hidrólise de fosfolípido inositol, mobilização de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosforilação de proteínas e exposição de receptor de fibrinogênio, ampliando desse modo as respostas de plaquetas na vizinhança (Siess, 1989; Herman, 1998).

Ambas as vias, formação de  $\text{TXA}_2$  e liberação de ADP, são mediadoras de secreção e agregação plaquetária irreversível induzidas por muitos estímulos. Contudo, estes diferem quanto à necessidade da atividade da ciclooxigenase para induzir tais respostas. Estímulos fracos como de ADP ou adrenalina, necessitam de agregação primária e produção de  $\text{TXA}_2$ . Estímulos fortes como aqueles de trombina ou colágeno, em altas concentrações, produzem secreção e agregação irreversível, através de mecanismos independentes da formação de  $\text{TXA}_2$ . Porém, em baixas concentrações, esses agonistas induzem agregação que depende inteiramente da formação de  $\text{TXA}_2$  e secreção de ADP (Siess, 1989; Herman, 1998).

O fator ativador de plaquetas (PAF) não é mais considerado a terceira via de ativação plaquetária, uma vez que estudos em plaquetas humanas demonstraram que a agregação induzida por PAF é modulada por inibidores da ciclooxigenase, indicando uma inter-relação com outras vias, particularmente aquela dependente da produção de  $\text{TXA}_2$  (Siess, 1989; Herman, 1998).

Recentemente foi proposta uma nova via de ativação plaquetária mediada pela liberação de uma metaloproteína, gelatinase A (Sawicki e cols., 1997; Herman, 1998).

#### **1.4 Inibidores da função plaquetária**

A trombose é iniciada pela perturbação do delicado equilíbrio que limita as interações do sangue com a parede vascular. Os fatores envolvidos nesse processo, que podem contribuir para a formação do trombo são: os constituintes do sangue (proteínas dos sistemas de coagulação e fibrinolítico, plaquetas e leucócitos), a parede do vaso (células endoteliais e componentes subendoteliais) e o fluxo sanguíneo. As funções desses vários elementos podem ser seletivamente alteradas, levando a diversos tipos de distúrbio trombótico. Conforme a natureza da principal disfunção envolvida, fármacos antitrombóticos planejados para corrigir especificamente esses defeitos podem ser

eficazes na prevenção ou tratamento de trombose. Os inibidores da agregação plaquetária, que atuam por diferentes mecanismos mencionados a seguir, constituem um importante aspecto da terapia antitrombótica (Beretz e Cazenave, 1991).

#### • Antagonismo do estímulo pró-agregação

Tanto a biossíntese da trombina pode ser evitada pelo uso oral de anticoagulantes (derivados cumarínicos), como sua atividade pode ser inibida por heparina, hirudina e pelo antagonista sintético de trombina, o argatroban (Herman, 1998).

As enzimas apirase e creatina fosfoquinase podem degradar o ADP. Os compostos do grupo das tienopiridinas (ticlopidina e clopidogrel) inibem especificamente e de modo irreversível, a ativação plaquetária por esse agonista (Siess, 1989; Herman, 1998). Foi mostrado que a ativação concomitante de dois receptores purinérgicos distintos ( $P_{2Y1}$  e  $P_{2TAC}$ ) é essencial para a ocorrência de agregação plaquetária induzida pelo ADP (Jantzen e cols., 1999). Na resposta das plaquetas a esse agonista, o clopidogrel atua como antagonista específico do receptor  $P_{2TAC}$  (suposto mediador da inibição de adenilil ciclase) e desse modo inibe a agregação (Gachet, 1995).

#### • Interferência no metabolismo do ácido araquidônico

A aspirina inibe a ciclooxigenase, ação que persiste durante todo o tempo de vida que resta às plaquetas, promovendo a acetilação irreversível da molécula dessa enzima, na serina 529 (aminoácido essencial para a sua atividade) o que bloqueia o acesso do substrato (ácido araquidônico) à tirosina 385, no seu sítio catalítico (Schorr, 1997).

Durante o processo de ativação, a inibição da ciclooxigenase impede a conversão do ácido araquidônico em endoperóxidos de prostaglandina ( $PGG_2$  e  $PGH_2$ ) e a subsequente formação de  $TXA_2$  nas plaquetas e de prostaciclina ( $PGI_2$ ), nas células endoteliais e outras células da parede vascular e do sangue.  $PGI_2$  é um potente inibidor fisiológico da agregação plaquetária e vasodilatador (Narjes e cols., 1997; Teng e Ko,

1998). Cabe ressaltar que agindo desse modo a aspirina inibe somente uma via de agregação plaquetária e portanto sua atividade antiagregante pode ser facilmente superada, pelo aumento do estímulo de ativação da plaqueta, por exemplo pela trombina ou colágeno (Herman, 1998; Teng e Ko, 1998).

Os inibidores da enzima tromboxano sintase, como por exemplo o imidazol interferem no metabolismo do ácido araquidônico, impedindo a conversão dos endoperóxidos (EPs) em  $\text{TXA}_2$ , e diferem da aspirina visto que não afetam desfavoravelmente o suprimento de EPs, precursores de  $\text{PGI}_2$ . Todavia, do mesmo modo que o  $\text{TXA}_2$ , seu precursor ( $\text{PGH}_2$ ) é capaz de induzir agregação e parece que ambos compartilham o mesmo tipo de receptor na plaqueta para produzir esse efeito (Packman e Mustard, 1980; Narjes e cols., 1997; Teng e Ko, 1998).

Os antagonistas do receptor  $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$  (9,11-iminoepoxi- $\text{PGH}_2$ , SQ29548, pinane- $\text{TXA}_2$  e outros) impedem a ação de ambos,  $\text{PGH}_2$  e  $\text{TXA}_2$  e não comprometem o fornecimento dos precursores de  $\text{PGI}_2$  (Siess, 1989; Barrie, 1990; Narjes, 1997; Teng e Ko, 1998).

Do ponto de vista terapêutico, a idéia de inibir a tromboxano sintase e bloquear o receptor  $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$  simultaneamente parece promissora. Nesse caso, a síntese de  $\text{TXA}_2$  seria inibida e a produção de  $\text{PGI}_2$  não só estaria assegurada, como até aumentaria. Além disso, o bloqueio do receptor  $\text{PGH}_2/\text{TXA}_2$  evitaria a possível indução de agregação plaquetária, pelo acúmulo de EPs, devido a inibição da tromboxano sintase. Teoricamente, a soma desses efeitos pode levar a um aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) em plaquetas e células do músculo liso, evento associado com forte inibição da atividade plaquetária e relaxamento do músculo liso (Narjes e cols., 1997; Herman, 1998; Teng e Ko, 1998).

#### • Aumento de AMPC ou GMPc

A etapa final do processo de ativação plaquetária, comum aos diversos agonistas e que leva a agregação, ou seja, o aumento do nível citosólico de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) livre e resultante exposição do receptor de fibrinogênio, glicoproteína IIb/IIIa ( $\text{GPIIb/IIIa}$ ), pode ser inibida por agentes químicos que causam o aumento da



concentração citosólica de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) ou guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Tais agentes, que serão mencionados a seguir, têm um amplo espectro de atividade, já que são capazes de inibir todas as vias de agregação plaquetária conhecidas (Herman, 1998; Folts e cols., 1999).

As prostaglandinas (PGs), especialmente a prostaciclina ( $PGI_2$ ) e em menor grau  $PGE_1$  e  $PGD_2$ , são importantes ativadores endógenos da adenilil ciclase, enzima que controla a síntese de AMPC na plaqueta. A estimulação da adenilil ciclase devido ao aumento da produção de prostaciclina ou emprego de iloprost, seu análogo quimicamente estável, resulta em elevação da concentração de AMPC e subsequente inibição da ativação plaquetária, através de mecanismos que envolvem a atuação da proteína quinase dependente de AMPC (Barrie, 1990; Herman, 1998; Folts e cols., 1999). Na via de transdução de sinal iniciada por um agonista, o AMPC pode interferir em muitas etapas individuais. Ele é capaz de inibir a formação de  $IP_3$  e DAG, mediada pela fosfolipase C; impedir o sinal de DAG para a ativação de PKC, e afetar diretamente a atividade de PKC. De modo mais importante, o AMPC inibe as respostas mediadas pelo cálcio ( $Ca^{2+}$ ), através de diversos mecanismos. Foi demonstrado que o AMPC regula tanto a entrada como a liberação de  $Ca^{2+}$  pelo sistema tubular denso da plaqueta. Promovendo a entrada de  $Ca^{2+}$  nesse local de armazenamento, com conseqüente diminuição da concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$  livre, o AMPC interfere em várias outras respostas da plaqueta, inclusive na liberação do ácido araquidônico pela fosfolipase  $A_2$  e contração do citoesqueleto, o que impede a secreção (Kroll e Schafer, 1989; Folts e cols., 1999).

O óxido nítrico, radical livre, lipofílico, que ocorre no estado gasoso é produzido pelas células do endotélio vascular e atua como potente ativador da guanilil ciclase, enzima que regula a síntese de GMPc (Schulz e Triggle, 1994). O aumento da produção endógena de óxido nítrico ou o uso de compostos doadores desse radical, tais como nitratos orgânicos e molsidomina, causa a elevação da concentração de GMPc, estimulada pela guanilil ciclase, o que resulta na inibição da ativação da plaqueta, por mecanismos que envolvem a atuação da proteína cinase dependente de GMPc (Herman, 1998; Folts e cols., 1999). Do mesmo modo que o AMPC, GMPc pode inibir

as respostas das plaquetas mediadas pelo aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, promovendo sua entrada no sistema tubular denso (Folts e cols., 1999).

A inibição de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (enzimas que degradam o AMPc e GMPc), por dipiridamol, papaverina, isobutil metilxantina e zaprinast, também resulta em elevação dos níveis citoplasmáticos desses nucleotídeos e subsequente inibição da ativação plaquetária (Barrie, 1990; Herman, 1998).

#### • Antagonismo do receptor glicoproteína IIb/IIIa

Independente do estímulo de ativação, o bloqueio do receptor GPIIb/IIIa impede a ligação de fibrinogênio, o que resulta na inibição da agregação de plaquetas (Narjes e cols., 1997; Herman, 1998). Uma nova classe de fármacos (antagonistas do receptor de fibrinogênio) com atividade inibitória de tal abrangência sobre a função plaquetária está sendo desenvolvida e inclui vários compostos mencionados a seguir. Um destes é o anticorpo monoclonal (c7E3 ou abciximab) dirigido contra o receptor GPIIb/IIIa. Do veneno de várias espécies de serpentes têm sido isolados muitos peptídeos que como o fibrinogênio contêm a seqüência de aminoácidos arginina - glicina - aspartato. Esses compostos, denominados desintegrinas, tem servido como modelo para o desenvolvimento de antagonistas de baixo peso molecular, do receptor GPIIb/IIIa. MK-852 e G4120 são exemplos de peptídeos cíclicos sintéticos baseados nesse modelo. Integrelin, um peptídeo cíclico sintético contendo lisina- glicina - aspartato, parece ser um inibidor mais específico que aqueles com a seqüência das desintegrinas. Outros antagonistas não peptídeos do receptor GPIIb/IIIa, lamifiban, tirofiban e xemlofiban já foram sintetizados. Os agentes químicos c7E3, integrelin, lamifiban, tirofiban e xemlofiban, atualmente submetidos a intensa avaliação clínica em humanos, têm demonstrado potente atividade antiagregante plaquetária, exibindo um perfil de segurança aceitável (Lefkovits e cols., 1995; Herman, 1998; Folts e cols., 1999).

## 1.5 Radicais livres e “espécies reativas de oxigênio”

Os radicais livres tem sido implicados na toxicidade de numerosos agentes químicos e na patogênese de muitas doenças, tais como: doenças inflamatórias, de Parkinson, doença de Alzheimer, fibrose pulmonar idiopática, nefrose autoimune, catarata, esclerose múltipla, porfiria, aterosclerose, câncer e artrite reumatóide entre outras. A lista dessas doenças é cada vez maior e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que essas moléculas reativas podem produzir a maioria das alterações teciduais, que tem sido identificadas em uma grande variedade de processos danosos. Muitas dessas alterações porém, podem ser uma consequência e não a causa do dano (Kehrer, 1993).

De maneira simples, um radical livre é qualquer espécie química independente, que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e tem vida muito curta devido á natureza livre de seus elétrons que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (Halliwell, 1994).

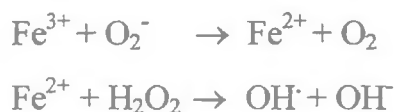
A expressão “espécies reativas de oxigênio” (ERO) é usada para designar os agentes potencialmente patogênicos derivados do metabolismo do oxigênio ( $O_2$ ): radicais livres e moléculas, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO) e outras, que embora tenham grupos funcionais contendo oxigênio quimicamente reativo, não possuem eletrons desemparelhados e portanto, não são radicais (Ferreira e Matsubara, 1997).

O homem está exposto a radicais livres e ERO geradas por radiações ionizantes, agentes tóxicos, poluentes ambientais, etc. Portanto, a idéia de que o perigo vem de fontes nocivas externas é correta. Porém, as células são também capazes de produzir ERO, tais como: o peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxila e óxido nítrico. Visto que participam de reações essenciais para o organismo, as ERO são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido por sistemas antioxidantes, endógenos de defesa (Sies, 1991).

O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (Halliwell e Gutteridge, 1986). Diversas moléculas biológicas como por

exemplo: a hemoglobina (Misra e Fridovich, 1972a), mioglobina (Gotoh e Shikama, 1976), catelocolaminas (Misra e Fridovich, 1972b) e alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (Turrens e cols., 1985) e microsômicos (Jakoby e Ziegler, 1990) reagem com o  $O_2$  convertendo-o em  $O_2^-$ . Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram o  $O_2^-$  em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (Halliwell e cols., 1988).

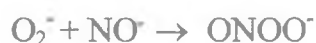
O radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos. Age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de: modificar as bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação de DNA, inibir diversas proteínas (constituintes de membranas celulares e enzimas) através da oxidação de seus grupamentos sulfidríla ( $-SH$ ) a pontes dissulfeto ( $-SS$ ) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (Halliwell e Gutteridge, 1986). O radical hidroxila é gerado nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal em transição, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), resulta na formação do radical hidroxila, pelo processo de radiólise da água (Halliwell, 1994). Os íons metálicos (de ferro ou cobre) tem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o  $OH^\cdot$  é formado pela interação entre um íon metálico ( $Fe^{3+}$ ), o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$ , de acordo com a seguinte equação:



Essa via de produção do  $OH^\cdot$ , conhecida como a reação de Haber-Weiss catalisada pelo ferro, tem sido muito estudada. Embora seu papel patológico não esteja

bem esclarecido, os meios utilizados pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres: ou seja, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, indiretamente indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (Liochev e Fridovich, 1994).

Desde a sua descoberta, como um mensageiro intracelular de produção endógena, tem sido demonstrado que o óxido nítrico (NO) desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (Eiserich e cols., 1998a). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, seu excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o  $O_2^-$  podem interagir, resultando um produto muito tóxico, o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), como se segue:



Esse composto é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição,  $OH^\cdot$ , dióxido de nitrogênio e outros, tem semelhante potencial deletério. Conseqüentemente, a toxicidade do óxido nítrico pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o  $O_2^-$ . O aumento da produção de  $ONOO^-$  tem sido associado a diversos processos patológicos (Demiryurek e cols., 1998; Eiserich e cols., 1998a).

#### • Atividade agregante plaquetária de “espécies reativas de oxigênio”

Estudos mostraram que agentes oxidantes tais como o ferro e o  $H_2O_2$  podem induzir a agregação de plaquetas humanas. Foi sugerido que associações entre a peroxidação lipídica induzida por metais e geração de radicais livres podem modular a função plaquetária (Principe e cols., 1985; Inasu e cols., 1990; Villalobos e cols., 1990).

Segundo Salvemini e Botting (1993) os radicais  $O_2^-$  e  $OH^\cdot$  podem ser produzidos no processo de ativação plaquetária. O radical superóxido é capaz de promover a liberação de serotonina, que tem propriedades vasodilatadora e agregante

plaquetária. O radical hidroxila induz agregação plaquetária, ativando a fosfolipase A<sub>2</sub> com conseqüente liberação e metabolismo do ácido araquidônico.

Recentemente, Prático e cols., (1999) demonstraram que ao interagir diretamente com plaquetas humanas o ferro promove sua ativação por um mecanismo que envolve a formação de OH<sup>•</sup>, via reação de Waber-Weiss. Esse radical ativa a PKC, que por sua vez estimula a liberação e metabolismo do ácido araquidônico, com resultante agregação plaquetária. Em outros estudos, com vários tipos de células, as ERO também manifestaram a habilidade de ativar a PKC (Palumbo e cols., 1992; Konishy e cols., 1997).

## 1.6 Defesas antioxidantes

Devido ao seu grande potencial de dano os radicais livres e ERO são produzidos no organismo sob rigoroso controle de sistemas de defesa que incluem enzimas e outros antioxidantes.

As superóxido dismutases (SOD), enzimas presentes na mitocôndria e citosol, convertem o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1992), como se segue:



As catalases, enzimas encontradas nos peroxissomos na maioria dos tecidos, removem o peróxido de hidrogênio catalizando sua redução em água e oxigênio molecular (Scott e cols., 1991), como se segue:



Glutationa peroxidases (GPX) são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria. Elas



promovem a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , às custas de glutathiona reduzida (GSH), para formar glutathiona oxidada (GSSG) e água (Gaté, 1999), de acordo com a seguinte reação:



A glutathiona (GSH), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, existe em concentrações milimolares em todas as células humanas e desempenha outros papéis igualmente importantes no metabolismo de xenobióticos e na síntese de leucotrienos (Halliwell, 1994).

Além desses sistemas enzimáticos existem outros antioxidantes. A albumina, proteína mais abundante no plasma, pode inativar diversos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1990). O alfa tocoferol (vitamina E), por ser suficientemente lipossolúvel, ocorre nas membranas das células e lipoproteínas. Embora possa evitar a ocorrência de peroxidação de lipídeos, eliminando radicais livres ( $\text{O}_2^-$  e  $\text{OH}^\cdot$ ), o alfa tocoferol (TH) atua, de modo mais importante, interrompendo a reação de propagação da lipoperoxidação, através da doação de um átomo de hidrogênio ao radical peroxila ou alcóxila produzido. Há evidência de que o ácido ascórbico é capaz de reduzir o radical toxoferoxila ( $\text{T}^\cdot$ ) formado, convertendo-o novamente em alfa tocoferol (Muller e Gross-Sampson, 1990). O urato, produto final do metabolismo das purinas encontrado nos fluidos do organismo, é também capaz de eliminar vários radicais livres (Kaur e Halliwell, 1990).

A análise dos dados da literatura revisada revelou que dentre os vários grupos de compostos, que ocorrem naturalmente em plantas, os flavonóides foram os mais citados por sua propriedade antioxidante. Estudos farmacológicos *in vitro* demonstraram que esses compostos podem eliminar os radicais  $\text{O}_2^-$  e peroxila lipídico e se ligar a íons metálicos, inativando-os (Catapano, 1997). *In vivo*, devido a sua ação antioxidante, a hispidulina preveniu a hepatotoxicidade causada pelo bromobenzeno em camundongos (Ferrandiz e cols., 1994); a silibina ofereceu proteção contra a hepatotoxicidade induzida pelo ferro em ratos (Pietrangelo e cols., 1995), a alfa G-rutina e luteolina associadas inibiram a cardiotoxicidade causada pela doxorubicina em camundongos (Sadzuka e cols., 1997) e a silimarina exerceu efeito protetor contra

a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em ratos (Mourelle e cols., 1989).

#### • Atividade antiagregante plaquetária de compostos antioxidantes

A função biológica do alfa tocoferol se deve a sua propriedade antioxidante. A ativação da plaqueta é um processo que consome oxigênio. No curso desse processo são formados peróxidos de lipídeos que se acumulam e são liberados da plaqueta. O fato de que os peróxidos de lipídeos são produtos secundários da conversão oxidativa do ácido araquidônico via ciclooxigenase, forneceu motivos para a investigação da potencial atividade antiagregante plaquetária do alfa tocoferol (Marcus, 1978).

Estudos mostraram que o alfa tocoferol exerce atividade antiagregante plaquetária frente a diversos agonistas, inibindo a atividade da ciclooxigenase e formação de peróxidos de lipídeos *in vitro* (Steiner e Anastasi, 1976; Fong, 1976; Agradi e cols., 1981; Galli e Socini, 1982).

Em plaquetas de humanos sob suplementação da dieta com o alfa tocoferol, foi observada a inibição da resposta de adesão ao colágeno, fibrinogênio e fibronectina (Steiner, 1991). Dados de estudo realizado por Freedman e cols., (1996) indicaram que a suplementação oral com alfa tocoferol está associada a inibição da agregação de plaquetas humanas por um mecanismo dependente de PKC.

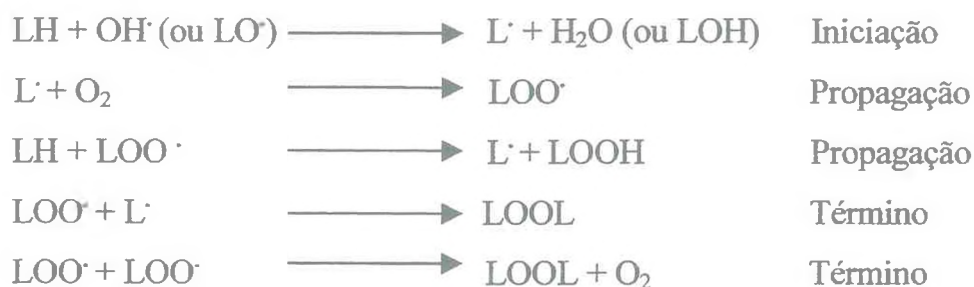
Além da atividade antioxidante notadamente apresentada, os flavonóides, segundo Beretz e Cazeneve (1991), são bons candidatos para o desenvolvimento de fármacos antitrombóticos, visto que atuam como potentes inibidores da função plaquetária. Alguns impedem a ação da fosfodiesterase de AMPc e outros da ciclooxigenase, enzimas que desempenham um papel-chave na ativação plaquetária.

### 1.7 Estresse oxidativo e inflamação

O estresse oxidativo foi definido por Sies (1991) como “uma perturbação do equilíbrio: pró-oxidante - antioxidante, em favor do primeiro, a qual é potencialmente capaz de causar dano celular”.



Uma consequência desse desequilíbrio é a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, processo denominado de lipoperoxidação. De maneira simples, a lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e término. Tais etapas estão apresentadas nas seguintes reações, onde L representa o lipídeo:



A reação acima inicia-se com a retirada do hidrogênio da molécula do ácido graxo poliinsaturado (LH) da membrana pelo  $OH^\cdot$  ou pelo  $LO^\cdot$  (radical alcoxila), com consequente formação do  $L^\cdot$  (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o  $L^\cdot$  reage rapidamente com o  $O_2$ , resultando em  $LOO^\cdot$  (radical peroxila), que por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado, formando novamente o  $L^\cdot$  na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais  $L^\cdot$  e  $LOO^\cdot$ , produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até destruírem-se a si próprios. A ocorrência da lipoperoxidação pode comprometer a estrutura da membrana, danificando-a ou eventualmente causar sua completa destruição culminando com a morte celular (Halliwell, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997).

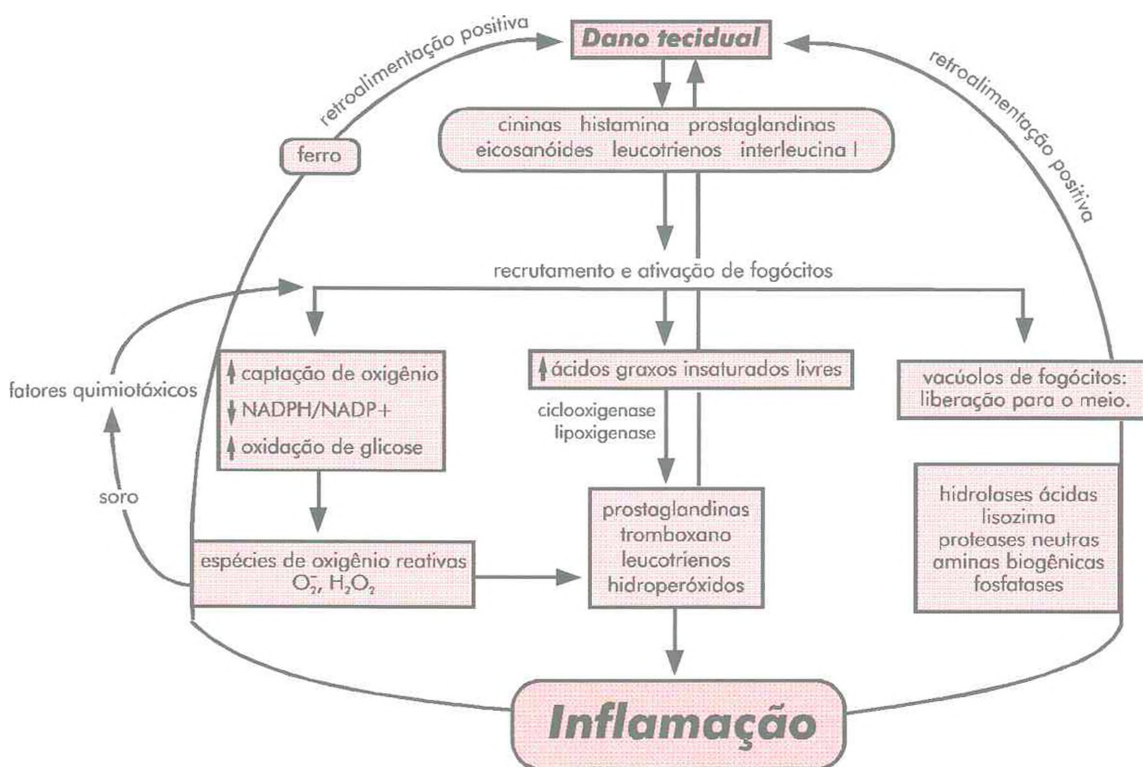
Com base na literatura revisada, o estresse oxidativo, uma das condições de dano celular mais estudadas atualmente, tem sido implicado em muitos processos patológicos. Dentre eles, inflamação, artrite reumatóide, aterosclerose, câncer e dano de reperfusão têm bases teórica e experimental que sustentam de forma mais consistente, um papel causal ou contributivo para o estresse oxidativo (Kehrer, 1993; Hancock, 1997).

A resposta inflamatória de um tecido danificado é um processo altamente complexo que envolve a liberação de numerosas citocinas, com consequente

recrutamento e ativação de fagócitos. Dados substanciais apontam as ERO como um importante componente da inflamação. Porém, apesar de sua atuação benéfica na destruição de organismos invasores e indução de fatores quimiotáticos, as ERO também podem agravar a lesão existente no tecido (Hancock, 1997).

Como parte da resposta inflamatória (**Figura 4**), as ERO, em sua maioria, são geradas por várias células fagocitárias que ativadas são capazes de produzir o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, em grande quantidade. Essas moléculas podem interagir com o ferro livre para formar o radical hidroxila, que é capaz de produzir dano adicional. Isso irá recrutar novos fagócitos e a produção de ERO, por sua vez, estimulará a formação de fatores quimiotáticos, levando a uma situação de retroalimentação positiva, que pode propagar a resposta inflamatória indefinidamente (Kehrer, 1993). Nessas condições, o ferro livre pode ocorrer por liberação do ferro quelado pelas ERO. Foi demonstrado que o  $O_2^-$  é capaz de mobilizar o ferro de sua proteína de transporte a ferritina, por redução (Samokyszyn e cols., 1988) e o  $H_2O_2$  pode libertar o ferro da hemoglobina, que deverá, infiltrar-se no tecido danificado (Gutteridge, 1986).

Os neutrófilos, fagócitos que tem um papel importante no processo inflamatório, contém a enzima mieloperoxidase. Embora a reação de Haber-Weiss catalizada pelo ferro, seja a via clássica de produção do  $OH^\cdot$ , há evidência de que uma via dependente dessa enzima pode contribuir para a formação desse radical (Morris e cols., 1995; Ramos e cols., 1995). A mieloperoxidase também promove a oxidação dependente de  $H_2O_2$ , de íons haleto e os ácidos hipohalosos resultantes, especialmente o ácido hipocloroso (HOCl), são oxidantes tão potentes quanto o  $OH^\cdot$  (Weiss e cols., 1983). Recentemente, essa enzima também foi implicada na formação de oxidantes inflamatórios derivados do óxido nítrico. Em neutrófilos ativados, o nitrito, principal produto de biotransformação do NO, pode ser convertido, por ação da



Kehrer, J. P. Crit. Rev. Toxicology (1993)

**FIGURA 4 - O papel das “espécies de oxigênio reativas” na inflamação (modificado de Kehrer, 1993).**

mieloperoxidase, em dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) e cloreto de nitrila ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ), compostos potencialmente muito nocivos (Eiserich e cols., 1998b).

Os dados anteriormente mencionados demonstram que os fagócitos são células potencialmente capazes de causar danos significativos durante a resposta inflamatória.

Cabe no entanto ressaltar que a inflamação, em geral, não é patológica, visto que a produção de EOR tem um alvo definido (organismos invasores) e é rigorosamente controlada por sistemas antioxidantes endógenos de defesa. Quando porém, é iniciada por um estímulo anormal e foge ao controle ou ocorre por tempo prolongado, a inflamação pode transformar-se em doença. Isso ocorre por exemplo: na artrite reumatóide e outras doenças caracterizadas por respostas inflamatórias crônicas (Lefkowitz, 1995; Hancock, 1997).

***OBJETIVOS***

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi estudar efeitos tóxicos e atividades farmacológicas da fração quinona de *A. oncocalyx*.

### 2.2 Específicos

⇒ Obter a fração hidrossolúvel (fração quinona) a partir de um extrato metanólico do cerne (caule) de *A. oncocalyx*;

⇒ Avaliar a toxicidade aguda da fração quinona em camundongos;

⇒ Determinar as atividades: antiagregante plaquetária, antioxidante, antiedematogênica e antinociceptiva da fração quinona e investigar os mecanismos de ação envolvidos.

***MATERIAL***

---

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Fração quinona de *Auxemma oncocalyx* Taub

A fração hidrossolúvel (fração quinona) foi obtida a partir do extrato metanólico de *A. oncocalyx*, gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa em Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, coordenado pelas professoras Telma Leda Gomes de Lemos e Otilia Desdenia Loiola Pessoa.

#### 3.2 Sangue humano

As amostras de sangue foram colhidas de doadores alunos, funcionários e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

#### 3.3 Animais

Ratos albinos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, de ambos os sexos, adultos, pesando de 100 a 250 g, foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e do Biotério Central da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal Paulista (UNIFESP).

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss-Webster, de ambos os sexos, adultos, pesando de 20 a 30 g, foram oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.4 Reagentes, soluções e outros

- Ácido acético glacial - (Merck, Alemanha)
- Ácido acetilsalicílico - (Sigma, U.S.A.)
- Ácido araquidônico - (Sigma, U.S.A.)



- Ácido ascórbico - (Sigma, U.S.A.)
- Ácido cítrico - (VETEC, Brasil)
- Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) - (Reagen, Brasil)
- Ácido tiobarbitúrico - (Reagen, Brasil)
- Ácido tricloroacético - (Reagen, Brasil)
- Adenosina-difosfato (ADP) - (Sigma, U.S.A.)
- Adrenalina - (Biopool, U.S.A.)
- Albumina sérica bovina - (Sigma, U.S.A.)
- Bicarbonato de sódio - (Reagen, Brasil)
- Carragenina ( $\lambda$ ) - (Sigma, U.S.A.)
- Citrato de sódio - (Reagen, Brasil)
- Citrato trissódico bihidratado - (Reagen, Brasil)
- Cloreto de cálcio - (Reagen, Brasil)
- Cloreto de magnésio - (Reagen, Brasil)
- Cloreto de potássio - (Reagen, Brasil)
- Cloreto de sódio - (Nuclear, Brasil)
- Colágeno - (Biopool, Brasil)
- Dextrano - (Sigma, U.S.A.)
- Dextrose - (Reagen, Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) - (Sigma, U.S.A.)
- Éter etílico - (Reagen, Brasil)
- Etilenoglicol (EGTA) - (Sigma, U.S.A.)
- Formaldeído - (Reagen, Brasil)
- Fosfato de potássio - (Reagen, Brasil)
- Fosfato de potássio monobásico - (Reagen, Brasil)
- Glicose anidra - (Reagen, Brasil)
- Heparina 5000 U.I. - (Cristália, Brasil)
- L-arginina - (Sigma, U.S.A.)
- Meperidina - (Hoescht, Brasil)
- Sulfato de morfina (Dimorf) - (Cristália, Brasil)

- Naloxona - (Sigma, U.S.A.)
- Oxalato de amônio - (Reagen, Brasil)
- Pentobarbital sódico - (Sigma, U.S.A.)
- Pentoxifilina (Trental) - (Hoescht, Brasil)
- Sulfato ferroso - (VETEC, Brasil)
- Tetracloreto de carbono - (Merck, Alemanha)
- 1,1,3,3 tetrametoxipropano - (Sigma, U.S.A.)
- TRIS (hidroximetil amino metano) - (Merck, Alemanha)
  
- Solução de trombina 710 U/ml em salina, gentilmente cedida pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- Solução tampão Tyrode/ACD (2:1, v/v) - pH 6,5 (de lavagem de plaquetas)

- Solução de Tyrode

KCl (cloreto de potássio)	2,61 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O (cloreto de magnésio)	1,04 mM
NaCl (cloreto de sódio)	136,87 mM
NaHCO <sub>3</sub> (bicarbonato de sódio)	12,08 mM
EGTA (etilenoglicol)	0,20 mM
Glicose anidra	6,10 mM
Albumina sérica bovina	15,18 mM

- Solução ACD

Ácido cítrico	41,64 mM
Dextrose	122,11 mM
Citrato de sódio	88,40 mM

- Solução tampão Tyrode/Cálcio - pH 7,4 (de ressuspensão de plaquetas)

KCL	2,61 mM
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,04 mM
NaCl	136,87 mM
TRIS (hidroximetil amino metano)	9,99 mM
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O (cloreto de cálcio)	0,87 mM
Glicose anidra	6,10 mM
Albumina sérica bovina	15,18 mM

- Solução tampão fosfato-salina (pH 7,4), contendo fosfato de potássio 40 mM e cloreto de potássio 140 mM
- Solução tampão fosfato (pH 7,4), contendo fosfato de potássio monobásico 50 mM
- Kit para a determinação de alanina amino transferase (ALT/GPT), método cinético - UV - Labtest, Brasil
- Kit para a determinação de aspartato amino transferase (AST/GPT), método cinético - UV - Labtest, Brasil

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

### 3.5 Equipamentos

- Balança analítica - *Metler e Marte* (Brasil)
- Liofilizador - *Metal-Lux* (Brasil)
- pHmetro - modelo - B374 - *Micronal* (Brasil)
- Centrífuga - modelo 215 - *Fanem* (Brasil)
- Agregômetro - modelo 450 - *Chrono - Log Co.* (U.S.A.) e registrador da mesma procedência
- Centrífuga refrigerada - modelo himac CR20B2 - *Hitachi* (Japão)
- Homogeneizador - modelo TE102 - *Marconi* (Brasil)
- Banho de água agitador - modelo G76 - *New Brunswick Scientific* (U.S.A.)
- Espectrofotômetro - modelo DU640B - *Beckman* (U.S.A.)
- Contador de cintilação líquida - modelo 1900TR - *Packard* (U.S.A.)
- Microscópio óptico - modelo LABO PHOT - *Nikon* (Japão)
- Pletismógrafo - modelo 7150 - *Ugo Basile* (Itália)
- Placa quente - modelo DS37 - *Ugo Basile* (Itália)
- Sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) - *Shimadzu* (Japão)
- Polígrafo - *Narco Biosystems* (U.S.A.)



## 4 MÉTODOS

### 4.1 Obtenção da fração quinona de *A. oncocalyx*

A planta, coletada na cidade de Pentecoste, estado do Ceará (região nordeste do Brasil), foi identificada pelo professor Afrânio Gomes Fernandes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a sua exsicata está depositada no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da UFC, sob o número 18459.

A coleta do material da planta (caule) e a preparação do extrato metanólico do cerne foram realizados pelo grupo de pesquisa em química de produtos naturais do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, que colaborou para a realização deste estudo. O extrato metanólico foi preparado conforme o método de Pessoa (1994), constituído das seguintes etapas:

- separação da madeira do caule em cerne e alburno
- secagem do cerne à temperatura ambiente
- trituração mecânica
- extração exaustiva com metanol a frio
- destilação em evaporador rotatório para a obtenção do extrato metanólico

A **Figura 5** mostra a marcha esquemática de obtenção do extrato metanólico do cerne de *A. oncocalyx*.

A oncocalixona A, um composto químico do grupo das quinonas, havia sido isolado do extrato metanólico do cerne de *A. oncocalyx* por Pessoa (1994). Na tentativa de obter um método eficiente e mais rápido de extração desse composto, o extrato metanólico (10 g) sofreu lavagem exaustiva com água, seguida de filtração. O filtrado foi submetido à liofilização para a obtenção de 2,5 g da fração hidrossolúvel.

A **Figura 6** mostra a marcha esquemática de obtenção da fração hidrossolúvel (fração quinona), a partir do extrato metanólico do cerne de *A. oncocalyx*.

A determinação semi-quantitativa da fração foi realizada, empregando um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), constituído



FIGURA 5 - Marcha esquemática de obtenção do extrato metanólico do cerne de *Auxemma oncocalyx*.

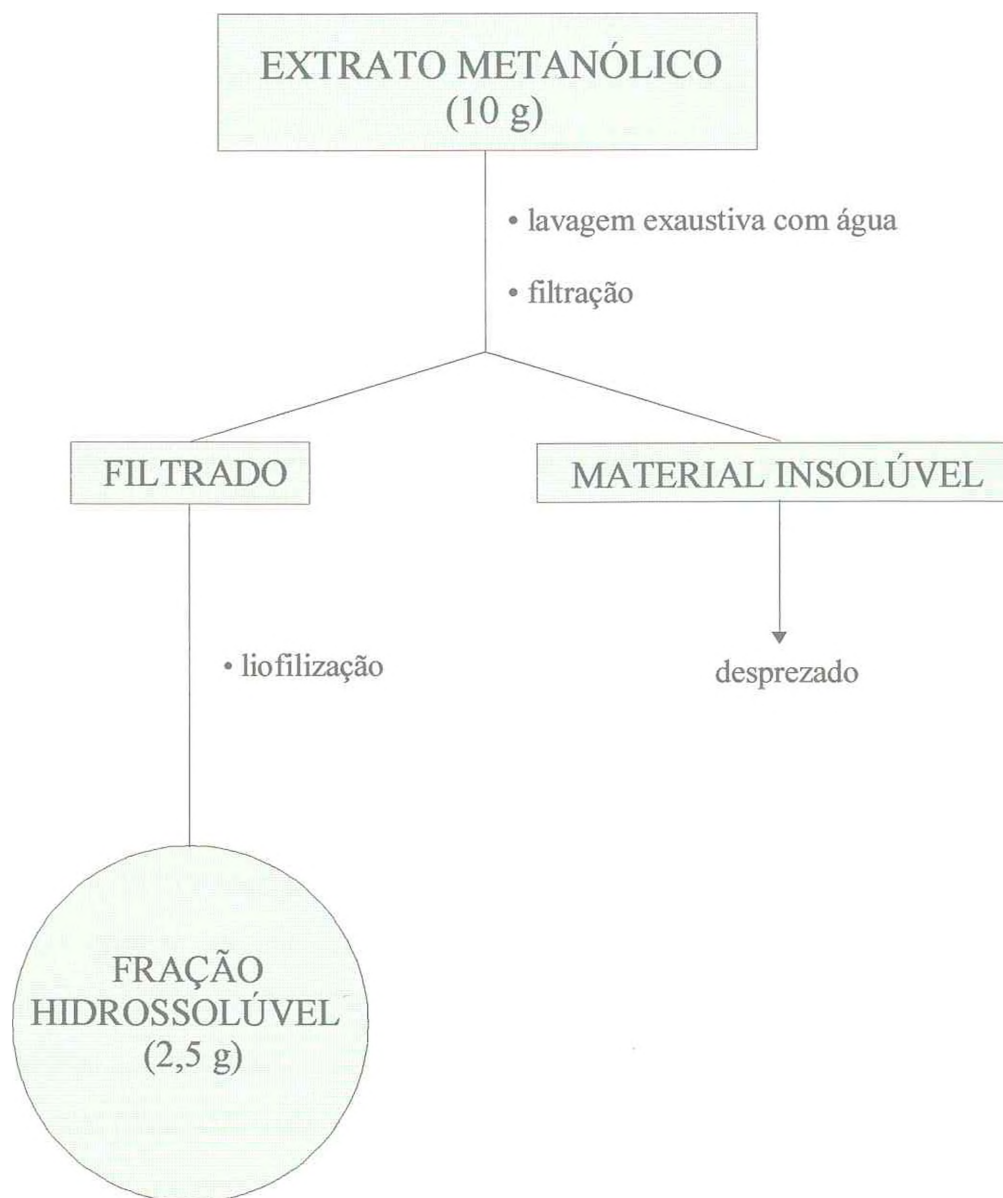


FIGURA 6 - Marcha esquemática de obtenção da fração hidrossolúvel, a partir do extrato metanólico do cerne de *Auxemma oncocalyx*.



por uma bomba LC-10AD, detector espectrofotométrico UV-VIS, SPD-10AV, operando a 280 nm, com coluna (YMC-Pack) C-18 (250,0 x 4,6 mm D.I., e partículas de 5 µm), fase móvel acetonitrila - água (1:1, v/v), velocidade de fluxo de 1ml/min e eluição isocrática à temperatura ambiente. Soluções de oncocalexona A e da fração hidrossolúvel, na concentração de 1 mg/ml em acetonitrila - água (1:1, v/v), foram preparadas e cada uma delas foi injetada no HPLC, no volume de 20 µl. Seus cromatogramas foram obtidos, utilizando-se um sistema para a aquisição de dados (Real Time Analysis, U.S.A.), em um microcomputador acoplado ao HPLC (Pessoa,1994).

#### **4.2 Avaliação da toxicidade aguda e de efeitos comportamentais da fração quinona de *A. oncocalyx* em camundongos**

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g) mantidos previamente em jejum por 12 h e divididos em grupos de 10 animais cada (tratados com a fração quinona e controle), foram utilizados para avaliar os efeitos comportamentais e a toxicidade aguda da fração. Esta foi testada nas doses de 500, 400, 300, 200, 150, 100 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.) e nas doses de 500, 200, 150, 100 e 50 mg/kg, por via oral (v.o.), administradas no volume de 10 ml/kg (i.p. ou v.o.), uma única vez. Os animais dos grupos que serviam de controle, receberam o veículo de dissolução da fração quinona (FQ), DMSO 2% em salina, no volume de 10ml/kg, i.p. ou v.o. Para cada uma das doses testadas, os animais do grupo tratado com FQ e seu respectivo controle foram observados por pelo menos 120 min logo após o tratamento e a cada 24 h, durante 3 dias. Dentre os sinais passíveis de serem detectados incluem-se: alteração acentuada da motilidade e da frequência respiratória, piloereção, movimentos estereotipados, tremores, convulsões, sedação, catatonia, analgesia, resposta modificada a estímulos (ruído, tato), alteração de cor e quantidade da urina, contorções abdominais, diarreia, coma e morte.

### ⇒ **Determinação da dose letal 50 %**

As diferentes doses da fração quinona administradas por via intraperitoneal em camundongos e o número de mortes observado com cada uma dessas doses, mostrados na **Tabela 1**, foram utilizados para a determinação da dose letal 50 % (DL50) de FQ e de seus limites inferior e superior, pelo método dos probitos, empregando o programa de computador, SPSS Professional Statistics 7,5 (1997).

O método estatístico dos probitos é adequado para estimar o efeito de uma ou mais variáveis independentes sobre uma variável dicotômica (tipo tudo ou nada). Desse modo, entre outros propósitos, serve para a análise da relação dose-resposta.

### **4.3 Determinação da atividade inibitória da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas *in vitro***

#### **4.3.1 Colheita do sangue**

O sangue para a realização deste estudo foi obtido de indivíduos aparentemente normais e saudáveis, não fumantes, em jejum prévio de 12 h, que relataram não estar fazendo uso de medicamentos por pelo menos duas semanas anteriores a colheita.

As amostras de sangue foram colhidas da veia antecubital, por punção utilizando agulha e seringa descartáveis e depositadas em tubos plásticos de centrífuga já contendo solução de citrato trissódico diidratado 3,8 % (9:1, v/v), como anticoagulante.

Os testes adequados para esse estudo foram realizados sempre, em um período de até 3 h após a colheita da amostra.

#### **4.3.2 Obtenção de plasma rico em plaquetas**

Inicialmente, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi separado após a centrifugação da amostra de sangue (2 vezes) a 1000 rpm, por 6 min, à temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi, em seguida, separado, após a centrifugação do restante da amostra a 3000 rpm, por 15 min, à temperatura ambiente.

A contagem de plaquetas no PRP foi feita segundo o método descrito por Brecher e Cronkite (1950), utilizando um microscópio ótico comum. O número foi ajustado, sempre que necessário, para aproximadamente 260.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, utilizando o PPP para a diluição do PRP. Finalmente, o PRP acondicionado em tubo plástico tampado foi reservado para a realização dos testes de agregação plaquetária.

#### **4.3.3 Teste de agregação plaquetária em PRP**

Os testes de agregação plaquetária foram realizados segundo o método turbidimétrico descrito por Born e Cross (1963), utilizando o agregômetro e registrador acoplados. Em uma cubeta de vidro do agregômetro, o fenômeno é induzido pela adição de um agente agregante ao PRP, o qual é mantido a uma temperatura constante de 37 °C, sob agitação contínua a 1200 rpm. A turvação do PRP, devido à presença de plaquetas em suspensão, diminui quando ocorre a agregação. Pela passagem de um feixe de luz através do PRP há aumento na transmitância, cuja medida é feita espectrofotometricamente e registrada na forma de uma curva que expressa a velocidade e quantidade de agregação.

#### **4.3.4 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP**

A ação inibitória da FQ sobre a agregação plaquetária foi determinada frente aos seguintes agonistas: ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina.

No caso do ADP, trombina, colágeno e ácido araquidônico foram utilizadas amostras de sangue de 10, 12, 10 e 12 indivíduos respectivamente. A colheita do sangue (amostra de 20 ml de cada doador) e a preparação do PRP foram realizados conforme descrito em 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente. Com a adrenalina o PRP empregado não foi proveniente de amostra de sangue de um indivíduo, mas de uma mistura (“pool”) de plasmas ricos em plaquetas obtidos de várias pessoas. Em cada um dos 6 ensaios realizados, foi utilizado um “pool” de PRP diferente.

Para cada amostra ou “pool” de PRP, FQ foi testada nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4 µg/ml. A curva de agregação plaquetária, para cada concentração de FQ, foi obtida transferindo uma alíquota de 450 µl de PRP e a solução da fração para

uma cubeta do agregômetro. Após a incubação dessa mistura por 5 min a 37 °C o agonista foi acrescentado. A curva de agregação do agonista (controle) foi obtida como descrito acima, exceto que neste caso o PRP foi incubado com salina (veículo de dissolução de FQ). As curvas relativas as diferentes concentrações de FQ foram obtidas entre curvas (controle) do agonista. A altura de cada curva, da linha de base onde teve início até o seu ponto máximo de agregação, foi medida em centímetros, com o auxílio de uma régua. A inibição da agregação plaquetária foi observada por comparação da altura de cada uma das curvas referentes as diferentes concentrações da fração com o valor médio da altura da curva do agonista (controle), em duplicata.

A solução de ADP foi utilizada na concentração final de 3  $\mu$ M no meio de reação para obter a curva de agregação expressa em 2 fases, ou seja, na forma de uma onda dupla. As soluções de trombina, colágeno e ácido araquidônico foram empregadas nas concentrações finais de 3,04 U/ml, 2,86  $\mu$ g/ml e 285,7  $\mu$ g/ml respectivamente no meio de reação, para obter curvas de agregação plaquetária que representam 90 % da resposta máxima. A solução de adrenalina na concentração final de 23,45  $\mu$ g/ml no meio de reação, foi utilizada para a obtenção da curva de agregação (onda dupla) expressa em 2 fases.

No caso do ADP, trombina, colágeno e ácido araquidônico, a análise estatística foi realizada, submetendo-se os dados obtidos a análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey - Kramer para comparações múltiplas. Os dados obtidos com a adrenalina foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey - Kramer para comparações múltiplas. Para isso foi empregado o programa de computador, GraphPad InStat (1993).

#### **4.3.5 Determinação da concentração inibitória 50% da fração quinona para diferentes agonistas**

Para a determinação da concentração inibitória 50 % da fração quinona, os dados obtidos frente aos agonistas testados foram primeiramente convertidos em valores de porcentagem de inibição da agregação plaquetária em relação ao controle (0 % de inibição). Utilizando o programa de computador, GraphPad InStat (1993), as

diferentes concentrações de FQ e seus correspondentes valores, em porcentagem de inibição, foram empregados no cálculo da reta de regressão e das concentrações inibitórias 16 % (IC16), 50 % (IC50) e 84 % (IC84) de FQ, para cada um dos ensaios realizados. As médias de IC16, IC50 e IC84 de FQ foram então determinadas para cada um dos agonistas testados e a partir desses valores, utilizando a análise quantal de Litchfield e Wilcoxon (1949) como procedimento estatístico, foram calculados o limite inferior e superior do valor de IC50 e a inclinação da reta, para cada agonista. Foram realizados testes de paralelismo com as retas e os valores de IC50 foram comparados entre si, para avaliar a potência com que FQ inibe a agregação plaquetária induzida pelos diferentes agonistas.

#### **4.3.6 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela fração quinona**

A influência do tempo de incubação de FQ com o PRP, sobre a inibição da agregação plaquetária, foi avaliada frente ao ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina, utilizando amostras de sangue de 3 indivíduos para cada um desses agonistas. A colheita do sangue (amostra de 20 ml de cada voluntário) e a preparação do PRP foram realizados conforme descrito em 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente. Para cada amostra, FQ foi testada na concentração de 35,7 µg/ml, com os períodos de incubação de 5, 10 e 20 min. As curvas de agregação do agonista (controle) e na presença de FQ, observando os períodos crescentes de tempo de incubação, foram obtidas para o ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina, como especificado em 4.3.4.

#### **4.3.7 Avaliação das plaquetas quanto a sua capacidade de agregar novamente após a inibição pela fração quinona**

A restauração da capacidade de agregação das plaquetas, após a sua inibição por FQ na concentração de 71,4 µg/ml, foi determinada frente à trombina e ao ácido araquidônico, utilizando amostras de sangue de 4 indivíduos para cada um desses agonistas. A colheita do sangue (amostra de 20 ml de cada voluntário) e a preparação do PRP foram realizados conforme descrito em 4.3.1 e 4.3.2 respectivamente.



Inicialmente, foi demonstrado o efeito inibitório de FQ sobre a agregação plaquetária induzida pelo agonista em PRP. Para isso, todo o PRP obtido de uma amostra foi dividido em partes iguais, em 2 tubos plásticos de centrifuga de 15 ml. Uma parte do PRP foi incubada com FQ, em um banho de água a 37 °C, por 5 min. Após a incubação, uma alíquota de 450 µl dessa mistura (contendo FQ na concentração de 71,4 µg/ml ) foi transferida para uma cubeta do agregômetro e a curva de agregação foi então obtida, acrescentando o agonista, trombina ou o ácido araquidônico, conforme especificado em 4.3.4. A outra parte do PRP foi incubada com salina, para a obtenção da curva de agregação do agonista (controle), procedendo como descrito acima.

Posteriormente, as plaquetas que haviam sido inibidas por FQ foram avaliadas quanto a sua capacidade de voltar a agregar novamente, após a lavagem. Para isso, a porção restante do PRP incubado com FQ, teve seu pH ajustado para 6,5 com solução de ácido cítrico 5 % e as plaquetas foram então lavadas para a retirada de FQ do meio de reação. O procedimento de lavagem utilizou o método de Mustard e cols., (1972), com algumas modificações introduzidas de acordo com a metodologia descrita por Mustard e cols., (1989) e Zucker (1989). O tampão Tyrode/ACD (2:1 v/v), pH 6,5 foi empregado para a lavagem das plaquetas por 2 vezes. Primeiramente, o tubo contendo o PRP, preenchido até o máximo de sua capacidade com o tampão, foi submetido a centrifugação a 3.000 rpm, por 15 min., à temperatura ambiente. Após descartar o sobrenadante, o precipitado de plaquetas resultante foi ressuspenso em pequeno volume do tampão. Novamente, o tubo foi preenchido com o tampão e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado de plaquetas foi ressuspenso em 1 ml do tampão de lavagem. A contagem das plaquetas foi feita como especificado em 4.3.2 e seu número foi ajustado para 260.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>, utilizando para isso o tampão Tyrode/Ca<sup>2+</sup>, pH 7,4. Finalmente, uma alíquota de 450 µl da suspensão de plaquetas lavadas foi transferida para uma cubeta do agregômetro e a curva de agregação foi então obtida acrescentando o agonista, trombina ou o ácido araquidônico, como especificado em 4.3.4. A porção restante do PRP incubado com

salina foi submetida à lavagem, para a obtenção da curva de agregação do agonista (controle) com a suspensão de plaquetas lavadas, procedendo como descrito acima.

#### **4.3.8 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária**

A potencialização por FQ da atividade inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária foi determinada em PRP proveniente de um “pool” obtido conforme descrito em 4.3.4. Em cada um dos 3 ensaios realizados, foi utilizado um “pool” de PRP diferente.

Primeiramente, foi determinada a curva (concentração-resposta) de inibição da agregação plaquetária pela aspirina. Nos experimentos subsequentes foi usada a concentração de aspirina (25  $\mu\text{M}$ ) que causou em média 10 % do seu efeito máximo. Do mesmo modo que a aspirina, FQ foi empregada na concentração de 17,8  $\mu\text{g/ml}$  para produzir o menor efeito inibitório sobre a agregação plaquetária induzida pelo ácido araquidônico (AA) na concentração de 285,7  $\mu\text{g/ml}$ .

A curva de agregação de FQ na presença de aspirina foi obtida transferindo para uma cubeta do agregômetro 450  $\mu\text{l}$  de PRP e aspirina 25  $\mu\text{M}$ . Após a incubação dessa mistura a 37 °C por 5 min, FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  foi acrescentada e a incubação foi mantida por mais 5 min, antes da adição de AA. A curva de agregação de AA (controle) foi obtida como descrito anteriormente, exceto que nesse caso o PRP foi incubado com o veículo de dissolução da aspirina (solução de bicarbonato de sódio 0,1 M) nos primeiros 5 minutos. Em seguida, o veículo de dissolução de FQ (salina) foi acrescentado e a incubação foi mantida por mais 5 min., antes da adição de AA. Curvas de agregação foram também obtidas por incubação de PRP apenas com a aspirina 25  $\mu\text{M}$  ou FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  por 5 min a 37 °C, antes da adição de AA. As curvas referentes a aspirina, FQ e FQ na presença de aspirina foram obtidas entre curvas de AA (controle). Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey - Kramer para comparações múltiplas.



#### **4.3.9 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da pentoxifilina sobre a agregação plaquetária**

A potencialização por FQ da atividade inibitória da pentoxifilina (PTX) sobre a agregação plaquetária foi determinada em PRP proveniente de um “pool” obtido conforme descrito em 4.3.4. Em cada um dos 10 ensaios realizados, foi utilizado um “pool” de PRP diferente.

Primeiramente, foi determinada a curva (concentração-resposta) de inibição da agregação plaquetária por PTX. Nos experimentos subsequentes foi usada a concentração de PTX (222,2 µg/ml) que causou em média 8 % do seu efeito máximo. Do mesmo modo que PTX, FQ foi empregada na concentração de 17,8 µg/ml para produzir o menor efeito inibitório sobre a agregação plaquetária induzida por ADP 3 µM.

A curva de agregação de FQ na presença de PTX foi obtida como especificado em 4.3.8, com as seguintes variações: PTX 222,2 µg/ml e o ADP foram utilizados no lugar da aspirina e de AA respectivamente. A curva de agregação controle do agonista (ADP) foi obtida como descrito em 4.3.8, exceto que neste caso o PRP foi incubado com salina (veículo de dissolução de PTX e de FQ) por 10 min. Utilizando o ADP, curvas de agregação foram também obtidas apenas para PTX 222,2 µg/ml (no lugar da aspirina) e FQ 17,8 µg/ml, conforme especificado em 4.3.8. As curvas referentes a PTX, FQ e FQ na presença de PTX foram obtidas entre curvas do ADP (controle). A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

#### **4.3.10 Determinação da ação da fração quinona sobre a inibição da agregação plaquetária causada pela L-arginina**

A ação da FQ, sobre a inibição da agregação plaquetária causada pela L-arginina (L-arg.), foi determinada em PRP proveniente de um “pool” obtido como descrito em 4.3.4. Em cada um dos 8 ensaios realizados foi utilizado um “pool” de PRP diferente.

Primeiramente, foi determinada a curva (concentração-resposta) de inibição da agregação plaquetária por L-arg. Nos experimentos subsequentes foi usada a

concentração de L-arg. (2,7 mg/ml) que causou em média 8 % do seu efeito máximo. Do mesmo modo que L-arg., FQ foi empregada na concentração de 17,8 µg/ml para produzir o menor efeito sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno 2,86 µg/ml.

A curva de agregação de FQ na presença de L-arg. foi obtida como especificado em 4.3.8, com as seguintes variações: L-arg. 2,7 mg/ml e o colágeno foram utilizados no lugar da aspirina e do AA respectivamente. A curva de agregação controle do agonista (colágeno) foi obtida como descrito em 4.3.8, exceto que neste caso o PRP foi incubado com salina (veículo de dissolução da L-arg. e de FQ) por 10 min. Utilizando o colágeno, curvas de agregação foram também obtidas para a L-arg. 2,7 mg/ml e FQ 17,8 µg/ml, conforme especificado em 4.3.8. As curvas referentes a L-arg., FQ e FQ na presença de L-arg. foram obtidas entre curvas do colágeno (controle). A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

#### **4.4 Determinação da atividade inibitória da fração quinona de *A. oncostylyx* sobre a agregação de plaquetas de ratos *in vitro***

##### **4.4.1 Colheita do sangue**

O sangue para a realização desse estudo foi obtido de ratos Wistar, machos (180 - 230 g), aparentemente normais e saudáveis e mantidos em jejum por um período de 12 h anterior a colheita.

As amostras de sangue foram colhidas do plexo orbicular, por punção utilizando um tubo capilar, sob leve anestesia com eter e depositadas em tubos plásticos de centrifuga já contendo solução de citrato trissódico diidratado 3,8 % (9:1, v/v), como anticoagulante.

##### **4.4.2 Obtenção do “pool” de plasma rico em plaquetas**

Amostras de sangue de vários animais foram colhidas como descrito em 4.4.1 e os plasmas ricos em plaquetas, preparados conforme especificado em 4.3.2, foram então misturados para formar um “pool” proveniente das diferentes amostras.

Os testes de agregação plaquetária em PRP foram realizados segundo o método de Born e Cross (1963), conforme descrito em 4.3.3, sempre em um período de até 3 h após a colheita do sangue.

#### **4.4.3 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP**

A ação inibitória de FQ, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina foi determinada em PRP proveniente de um “pool” obtido conforme descrito em 4.4.2. Com cada agonista foram realizados 6 ensaios utilizando “pools” de PRP diferentes.

FQ foi testada nas concentrações de 88,9 e 177,8  $\mu\text{g/ml}$  e a curva de agregação para cada uma dessas concentrações foi obtida transferindo uma alíquota de 450  $\mu\text{l}$  de PRP e a solução da fração para uma cubeta do agregômetro. Após a incubação dessa mistura a 37 °C, por 5 min., o agonista foi acrescentado. A curva de agregação do agonista (controle) foi obtida como descrito anteriormente, exceto que o PRP foi incubado com o veículo de dissolução de FQ (salina). As curvas referentes as diferentes concentrações de FQ foram obtidas entre curvas do agonista (controle). As soluções de ADP e trombina foram utilizadas nas concentrações de finais de 20  $\mu\text{M}$  15,8 U/ml, respectivamente, no meio de reação e as curvas de agregação obtidas (correspondendo à cerca de 90 % da resposta máxima) foram reversíveis. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada como especificado em 4.3.8.

#### **4.5 Determinação da atividade da fração quinona de *A. oncostylyx* administrada pela via intraperitoneal sobre a agregação de plaquetas em ratos**

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g), foram divididos em grupos de 6 animais cada (tratados com FQ e controle). Um grupo foi tratado com FQ na dose de 10 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p., 1 vez ao dia, durante 5 dias. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p. No quinto dia, 30 min. após o tratamento, o sangue dos animais foi colhido conforme descrito em 4.4.1.

A determinação *ex vivo*, da atividade da FQ sobre a agregação plaquetária, foi feita em PRP proveniente de um “pool” obtido, como especificado em 4.4.2, para cada um dos grupos (tratado com FQ e controle).

A curva de agregação (em duplicata), referente ao grupo tratado com FQ, foi obtida transferindo uma alíquota de 450  $\mu$ l de PRP, do “pool” obtido desses animais, para uma cubeta do agregômetro, a qual foi acrescentado o ADP na concentração de 20  $\mu$ M. A curva de agregação do ADP (controle) foi obtida como descrito anteriormente, exceto que nesse caso foi utilizado o “pool” de PRP proveniente do grupo de animais que receberam salina.

O efeito de FQ nas doses de 30 e 60 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., 1 vez ao dia, durante 5 dias, foi avaliado como descrito antes. A única variação foi que o grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ nessas doses) no volume de 10 ml/kg, i.p.

Com cada uma das doses de FQ testadas foram realizados 4 experimentos. O teste *t student* não pareado foi utilizado para a análise estatística dos dados obtidos com FQ 10 mg/kg. No caso das doses de 30 e 60 mg/kg a análise estatística dos resultados foi realizada como especificado em 4.3.8.

#### **4.6 Avaliação da administração oral por tempo prolongado da fração quinona de *A. oncostylyx* sobre a agregação plaquetária e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue em ratos**

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram divididos em 2 grupos de 6 animais cada. Um grupo foi tratado com FQ na dose de 50 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, v.o., 1 vez ao dia, durante 15 dias. O grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, v.o.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram avaliados em cada um dos animais dos grupos (tratado com FQ e controle), antes e no final do tratamento. Os testes de agregação plaquetária foram realizados no sétimo e no último dia, com 1h após o tratamento. Para isso, o sangue dos animais (em jejum prévio por 12 h) foi colhido conforme descrito em 4.4.1. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos

foram determinados em sangue, com EDTA (1 - 2 mg/ml) como anticoagulante e soro, respectivamente, por métodos apropriados à automatização, no Laboratório Central do Hospital Universitário da UFC. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

O efeito de FQ sobre a agregação plaquetária foi determinado a partir de sangue, com solução de citrato trissódico diidratado 3,8 % (9:1, v/v) como anticoagulante, utilizando PRP proveniente de um “pool” obtido (como especificado em 4.4.2) para cada um dos grupos, tratado com FQ e controle. Curvas de agregação (em duplicata) induzidas por ADP foram obtidas (conforme descrito em 4.5) para cada um desses grupos.

#### **4.7 Determinação da atividade da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre o tempo de sangramento em camundongos**

##### **4.7.1 Após a administração intraperitoneal**

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram divididos em grupos (tratados com FQ e controle). FQ foi testada nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p., administradas no volume de 10 ml/kg, uma única vez. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p.

O tempo de sangramento foi medido (em segundos) antes e com 1, 3, 6 e 24 h após o tratamento, segundo o método modificado de Tanaka e cols., (1998), procedendo conforme descrito a seguir. No animal consciente, a cauda foi cortada à cerca de 2 mm de sua extremidade, utilizando uma lâmina. Em seguida, o tempo de sangramento foi medido, observando a mancha de sangue produzida pelo corte em um papel de filtro, a intervalos de aproximadamente 30 seg. O período de tempo decorrido entre a incisão e o estancamento do sangue foi registrado. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.



#### **4.7.2 Após a administração oral**

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g), mantidos previamente em jejum por 12 h, foram divididos em grupos (tratados com FQ e controle). FQ foi testada nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, v.o., uma única vez. O grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina, (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, v.o., uma única vez.

O tempo de sangramento foi medido conforme o procedimento descrito em 4.7.1, exceto que nesse caso não foi realizada a medida, com 6 h após o tratamento. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme especificado em 4.3.8.

#### **4.8 Determinação do número de plaquetas em sangue total após a administração intraperitoneal da fração quinona de *A. oncocalyx* em camundongos**

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram divididos em grupos (tratados com FQ e controle). FQ foi testada nas doses de 30 ou 60 mg/kg, i.p., administradas no volume de 10 ml/kg, uma única vez. O grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p. Três horas após o tratamento, o sangue dos animais foi colhido do plexo orbicular, conforme descrito em 4.4.1, utilizando o EDTA 1 - 2 mg/ml, como anticoagulante. O método de Rees - Ecker (Platt, 1972), foi utilizado para a contagem de plaquetas, empregando-se microscópio ótico comum. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

#### **4.9 Determinação do efeito da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a musculatura lisa vascular**

Ratos Wistar, machos (200 - 250 g) foram sacrificados por deslocamento cervical e a aorta torácica foi excisada e dissecada cuidadosamente para preservar o máximo possível a integridade da função endotelial. Segmentos de aorta (anéis) de aproximadamente 5 mm, foram montados horizontalmente em banhos para a obtenção de registro isométrico, através de transdutores de força acoplados a um polígrafo de 4

canais. Os anéis foram mantidos sob tensão basal de 1 g, em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4; 37 °C) de composição (mM): NaCl 118, KCl 4,7, CaCl<sub>2</sub> 1,8, MgSO<sub>4</sub> 1,2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glicose 5,5 e oxigenados com a mistura de 95 % de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a montagem foi observado um período de repouso da preparação por 1 hora, com lavagens sucessivas de 15 em 15 minutos antes do início dos protocolos experimentais. Após esse período, os anéis foram contraídos com solução Krebs-Henseleit despolarizante [K<sup>+</sup> 60 mM], obtida por substituição de NaCl por KCl em bases equimolares, para evidenciar a integridade da preparação e a reprodutibilidade da resposta contrátil. A subsequente adição de carbacol (1mM) serviu para avaliar funcionalmente a preservação do endotélio. A seguir curvas concentração-efeito (4 no total) foram construídas, variando linearmente a concentração de FQ de 0,22 a 225,28 µg/ml. Os dados expressos como porcentagem da contração tônica induzida pela solução despolarizante (% KCl) foram apresentados como resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e concentração necessária para produzir 50% da R<sub>máx</sub> (CE50), com intervalo de confiança de 95 %. O cálculo da CE50 foi realizado por interpolação logarítmica, utilizando o programa de computador “GRAPH PAD PRISM 2.0 for Windows”.

#### **4.10 Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de *A. oncocalyx* in vitro**

A atividade antioxidante de FQ foi determinada com base na sua capacidade de inibir a lipoperoxidação que ocorre espontaneamente, quando o homogeneizado de cérebro de rato é incubado sob condições controladas, conforme o método de Stocks e cols., (1974). A produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a emissão de quimiluminescência (QL) foram os parâmetros utilizados para a avaliação do grau de peroxidação lipídica.

##### **4.10.1 Obtenção do homogeneizado de cérebro de rato**

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados para a obtenção do homogeneizado de cérebro, conforme descrito a seguir. Os animais foram anestesiados



com eter e sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, o cérebro foi submetido à perfusão através da veia cava superior, com solução tampão fosfato - salina, pH 7,4 (contendo fosfato de potássio 40 mM e cloreto de sódio 140 mM), gelada. Posteriormente o cérebro foi removido e homogeneizado em um volume de tampão de 4 vezes o seu peso. O homogeneizado foi centrifugado a 1000 g, na temperatura de 4 °C, por 15 min e o sobrenadante foi separado e diluído (3 vezes) com o tampão fosfato - salina. Este foi ,então, reservado para a determinação de TBARS e QL.

#### **4.10.2 Determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico**

No homogeneizado diluído, obtido como descrito em 4.10.1, TBARS foi determinado antes e após a incubação do homogeneizado, na ausência e na presença de FQ, de acordo com o método de Fee e Teitelbaum (1972), procedendo como descrito a seguir. FQ foi testada nas concentrações de 16,39; 8,20; 4,10; 2,05 e 1,03 µg/ml e para isso a fração na concentração final desejada e no volume de 50 µl, foi adicionada a uma amostra (em duplicata) de 3 ml do homogeneizado. Uma alíquota de 1 ml dessa mistura foi transferida para um tubo de centrífuga ( $T_0$ ) e reservada. Esta serviu para a determinação de TBARS, antes da incubação. O conteúdo restante da mistura foi incubado por 60 min, sob agitação em um banho de água a 37 °C, regulado para desenvolver 160 oscilações por min. Uma alíquota de 1 ml dessa mistura foi transferida para um tubo de centrífuga ( $T_{60}$ ), a qual serviu para a determinação de TBARS, após a incubação. A cada um dos tubos ( $T_0$  e  $T_{60}$ ) foi adicionado 1 ml de solução de ácido tricloroacético (TCA) 5 %. Após a agitação, os tubos foram submetidos à centrifugação a 3000 rpm, por 15 min. O volume de 1 ml do sobrenadante foi transferido para seu respectivo tubo de ensaio, ao qual foi acrescentado 1 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 %. Após a agitação vigorosa, os tubos ( $T_0$  e  $T_{60}$ ) foram mantidos em banho de água fervente por 20 min. Em seguida, os tubos foram colocados em banho de gelo e após o seu resfriamento até a temperatura ambiente, a absorbância do pigmento de cor rosa formado foi medida a 535 nm em um espectrofotômetro. A determinação de TBARS no controle foi

realizada em uma amostra (em duplicata) de 3 ml do homogeneizado, acrescida de salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 50  $\mu$ l.

Para cada concentração testada, a capacidade antioxidante (CAO) de FQ, expressa em porcentagem em relação ao controle foi calculada empregando a seguinte equação:

$$(\text{CAO})_{\text{TBARS}} = 100 \left[ 1 - \frac{\text{TBARS}_{60} - \text{TBARS}_0}{\text{TBARS}'_{60} - \text{TBARS}'_0} \right]$$

Onde  $\text{TBARS}'_{60}$  e  $\text{TBARS}_{60}$  representam as médias dos valores de absorbância (em duplicata) medidos após a incubação (por 60 minutos) do homogeneizado, na ausência (controle) e na presença de FQ respectivamente.  $\text{TBARS}'_0$  e  $\text{TBARS}_0$  representam as médias dos valores de absorbância (em duplicata) determinados antes da incubação do homogeneizado, na ausência (controle) e na presença de FQ respectivamente.

#### 4.10.3 Medida de quimiluminescência

No homogeneizado diluído, obtido como descrito em 4.10.1, a QL foi determinada antes e após a incubação do homogeneizado, na ausência e na presença de FQ, conforme descrito a seguir. FQ foi testada nas concentrações de 8,20; 4,10; 2,05 e 1,02  $\mu$ g/ml e para isso a fração, na concentração final desejada e no volume de 50  $\mu$ l, foi adicionada a uma amostra (em duplicata) de 3 ml do homogeneizado. Após a agitação da mistura, a QL emitida foi medida como descrito por Lissi e cols., (1986), utilizando um contador de cintilação líquida. A determinação de QL no controle foi realizada em uma amostra (em duplicata) de 3 ml do homogeneizado, acrescida de 50  $\mu$ l de salina.

Para cada concentração testada, a capacidade antioxidante de FQ (CAO), expressa em porcentagem em relação ao controle, foi calculada empregando a seguinte equação:

$$(\text{CAO})_{\text{QL}} = 100 \left[ 1 - \frac{\text{QL}_{60} - \text{QL}_0}{\text{QL}'_{60} - \text{QL}'_0} \right]$$

Onde  $QL'_{60}$  e  $QL_{60}$  representam as médias dos valores de QL (em duplicata) medidos após a incubação (por 60 minutos) do homogeneizado, na ausência (controle) e na presença de FQ respectivamente.  $QL'_0$  e  $QL_0$  representam as médias dos valores de QL (em duplicata) determinados antes da incubação do homogeneizado, na ausência (controle) e na presença de FQ respectivamente.

#### **4.11 Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de *A. oncocalyx* *in vivo***

##### **4.11.1 Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em rato**

- **Avaliação da função hepática, observação histopatológica e medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido, 72 h após a administração de  $CCl_4$**

A ação da FQ na hepatotoxicidade causada pelo  $CCl_4$  foi determinada de acordo com Lin e cols (1998), conforme descrito a seguir.

##### **⇒ Protocolo de administração de FQ e coleta do tecido**

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram divididos em 4 grupos de 8 animais cada. O grupo 1, que serviu de controle, recebeu o veículo de dissolução de FQ (salina 10 ml/kg, i.p.) e o veículo de dissolução de  $CCl_4$  (óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.). Nos animais dos outros 3 grupos, a solução de  $CCl_4$  50 % em óleo de oliva foi injetada no volume de 3 ml/kg, s.c. Os grupos 3 e 4 foram tratados com FQ nas doses de 10 e 30 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p., respectivamente, 30 min antes e 24 e 48 h após a injeção de  $CCl_4$ . O sangue dos animais, para a medida da função hepática, foi colhido conforme descrito em 4.4 1, utilizando a heparina como anticoagulante, 72 h após a administração do  $CCl_4$ . Em seguida, cada animal foi sacrificado e o fígado removido. Uma parte do fígado, foi fixada em formalina neutra a 10 % e reservada para a observação histopatológica. Outra porção serviu para a medida dos níveis de lipoperoxidação.

### ⇒ Medida da função hepática

As amostras de sangue, após a colheita realizada como descrito anteriormente, foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm, por 5 min e o plasma foi separado para a determinação da atividade das enzimas alanina amino transferase (ALT/GPT) e aspartato amino transferase (AST/GOT), por métodos apropriados a automatização, no Laboratório Central do Hospital Universitário da UFC. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

### ⇒ Observação histopatológica

O tecido hepático reservado para a observação histopatológica, após uma semana de fixação em solução de formalina neutra a 10 %, foi desidratado com a seqüência de soluções aquosas contendo etanol 50 - 100 % e embebido em parafina. Cortes em seções de 5 µm foram corados com hematoxilina - eosina e observados com o auxílio de um microscópio ótico.

As alterações morfológicas investigadas foram as seguintes: alteração gordurosa, infiltração de linfócitos e necrose celular.

### ⇒ Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático

O grau de lipoperoxidação no tecido hepático homogeneizado foi medido através da determinação dos níveis de TBARS, conforme o método de Huang e cols., (1998), seguindo o protocolo descrito a seguir.

Uma porção do fígado foi homogeneizada em um volume de 9 vezes o seu peso, com solução de KCl 1,15 %, gelada. Em um tubo de centrífuga, foram adicionados 0,5 ml do homogeneizado, 0,9 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 7,4 e 0,5 ml do sistema catalizador da formação de radicais livres, contendo FeSO<sub>4</sub> 0,01 mM e ácido ascórbico 0,1 mM. Após a incubação dessa mistura a 37 °C, por 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 1 ml de solução de TCA 10 %. Em seguida, a mistura foi submetida a centrifugação a 3000 rpm por 15 min, o sobrenadante foi separado e acrescido de 1 ml de solução de TBA 0,8 %. Após a agitação, essa mistura foi mantida

em um banho de água fervente por 15 min e em seguida colocada em um banho de gelo. Aguardado o resfriamento até a temperatura ambiente, a absorbância do pigmento de cor rosa formado foi medida a 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os dados, calculados a partir de uma curva padrão de malonildialdeído (MDA), expressos em nmol de MDA/g de tecido, foram submetidos à análise estatística realizada como especificado em 4.3.8.

#### **4.11.2 Prolongamento por CCl<sub>4</sub> do tempo de sono induzido por pentobarbital**

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) separados em grupos de 10 animais cada (tratados com FQ e controle) foram utilizados para o estudo da ação de FQ, diretamente sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital e sobre o prolongamento por CCl<sub>4</sub> do tempo de sono induzido pelo pentobarbital, de acordo com Monttila e cols., (1990), conforme descrito a seguir.

A ação direta de FQ foi investigada, nas doses de 10 e 30 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes do tratamento dos animais com pentobarbital na dose de 40 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p. O tempo de sono (período que o animal permaneceu dormindo) foi registrado em segundos, após a injeção de pentobarbital. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ), no volume de 10 ml/kg, i.p.

FQ também foi testada nas doses de 10, 30, 100 e 200 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, v.o., uma única vez, 60 min antes da administração do pentobarbital 40 mg/kg, i.p. O tempo de sono foi registrado em segundos, após a injeção do pentobarbital. O grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ), no volume de 10 ml/kg, v.o. Os animais utilizados na execução desse protocolo foram mantidos previamente em jejum por 12 h.

No protocolo de prolongamento da ação do CCl<sub>4</sub>, FQ foi testada nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez. Para isso foram utilizados 5 grupos de 10 animais cada. O grupo 1 (controle) recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) e o pentobarbital. Aos outros 4 grupos, a solução de CCl<sub>4</sub> 20 % em óleo de oliva foi injetada no volume de 3 ml/kg, s.c. Os grupos 3, 4 e 5

foram tratados com FQ nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg respectivamente, 30 min antes da injeção do CCl<sub>4</sub>. Aguardado o período de 24 h após a administração do CCl<sub>4</sub>, os 5 grupos de animais foram tratados com o pentobarbital 40 mg/kg, i.p. e em seguida o tempo de sono foi registrado em segundos.

FQ também foi testada nas doses de 10, 30 100 e 200 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, v.o., uma única vez. Para isso foram utilizados 6 grupos de 10 animais cada. O grupo 1 (controle) recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ) e o pentobarbital. Aos outros 5 grupos, a solução de CCl<sub>4</sub> 20 % em óleo de oliva foi injetada no volume de 3 ml/kg, s.c. Aguardado o período de 24 h após a administração do CCl<sub>4</sub>, os 6 grupos foram tratados com o pentobarbital 40 mg/kg, i.p. e em seguida o tempo de sono foi registrado em segundos. Os animais utilizados na execução desse protocolo foram mantidos previamente em jejum por 12 h. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada como descrito em 4.3.8.

#### **4.12 Determinação da atividade antiedematogênica da fração quinona de *A. oncocalyx***

##### **4.12.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em rato**

Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) divididos em grupos de 6 animais, foram utilizados para determinar a ação da FQ no modelo de edema de pata induzido por carragenina, segundo o método de Winter e cols., (1962), conforme descrito a seguir.

FQ foi testada nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., 30 min antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a injeção de carragenina, utilizando um pletismógrafo. O volume do edema, com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a administração de carragenina, foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de carragenina. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p.

FQ também foi testada nas doses de 100 e 200 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, v.o., uma única vez, 1 h antes da injeção de carragenina. Para



cada animal, o volume do edema foi determinado com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a administração de carragenina, conforme descrito anteriormente. O grupo controle recebeu DMSO 2 % em salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, v.o. Os animais utilizados nesse protocolo foram mantidos previamente em jejum por 12 h. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada como especificado em 4.3.8.

#### **4.12.2 Modelo de edema de pata induzido por dextrano em rato**

Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) divididos em grupos de 6 animais, foram utilizados para determinar a ação da FQ no modelo de edema de pata induzido por dextrano, segundo o método de Parrat e West (1958), conforme descrito a seguir.

FQ foi testada nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., 30 min antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de dextrano 1,5 % na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e com  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de dextrano, utilizando um pletismógrafo. O volume do edema, com  $\frac{1}{2}$ , 1, 2, 3 e 4 h após a administração de dextrano, foi determinado pelo cálculo da diferença entre o volume da pata medido nesses intervalos de tempo e o seu volume determinado antes da injeção de dextrano. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

### **4.13 Determinação da atividade antinociceptiva da fração quinona de *A. oncocalyx***

#### **4.13.1 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos**

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g), divididos em grupos de 10 animais foram utilizados para investigar a ação da FQ no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, segundo o método de Koster e cols., (1959), conforme descrito a seguir.



FQ foi testada nas doses de 0,1, 1, e 5 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção da solução de ácido acético 0,6 %, no volume de 10 ml/kg, i.p. A partir de 10 min após o tratamento dos animais com o ácido acético, o número de contorções foi registrado durante 20 min. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ), no volume de 10 ml/kg, i.p. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

#### 4.13.2 Teste da formalina

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g), divididos em grupos de 6 animais foram utilizados para determinar o efeito de FQ no teste da formalina, segundo o método de Hunskaar e cols., (1985), conforme descrito a seguir.

FQ foi testada nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de formalina 1 %, na pata traseira, direita do animal. O tempo (em segundos), gasto pelo animal lambendo a pata, foi registrado durante os primeiros 5 min (fase inicial) e com 20 até 25 min (fase tardia) após a injeção de formalina. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p. A meperidina (fármaco opióide) foi utilizada como controle positivo, na dose de 20 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p. Esse teste, de acordo com a recomendação de Tjolsen e cols., (1992), foi realizado a temperatura ambiente de 26 - 28°C, na ausência de fatores estressantes tais como sons, odores e grande luminosidade, que pudessem causar alterações no comportamento dos animais.

Para investigar o envolvimento do sistema opióide, no efeito de FQ sobre a nocicepção induzida por formalina, foram utilizados camundongos divididos em 5 grupos de 6 animais cada. O grupo 1 (controle) recebeu salina. O grupo 2 foi tratado com FQ na dose de 30 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção de formalina como descrito anteriormente. Ao grupo 3 foi administrada morfina na dose de 5mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção de formalina. O grupo 4 foi tratado com FQ 30 mg/kg, i.p., 15 min após a administração de naloxona (antagonista opióide) na dose de 2 mg/kg, no

volume de 10 ml/kg, s.c. e 30 min antes da injeção de formalina. O grupo 5 recebeu morfina 5 mg/kg, i.p., 15 min após a administração de naloxona 2 mg/kg, s.c. e 30 min antes da injeção de formalina. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada como descrito em 4.3.8.

#### **4.13.3 Teste da placa quente**

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g), divididos em grupos de 10 animais foram utilizados para investigar a ação da FQ no teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimback (1953), conforme descrito a seguir.

No teste, foram empregados somente os animais previamente selecionados ou seja, aqueles que ao serem colocados sobre uma placa de metal aquecida a  $55,0 \pm 0,5$  °C, responderam ao estímulo térmico em cerca de 20 segundos, lambendo as patas traseiras e/ou saltando sobre a placa.

FQ foi testada nas doses de 5, 10 e 30 mg/kg, administradas no volume de 10 ml/kg, i.p., uma única vez. Para cada animal, o tempo (em segundos) decorrido até a manifestação da resposta ao estímulo térmico, foi registrado antes e com 30, 60 e 90 min após a administração de FQ. O grupo controle recebeu salina (veículo de dissolução de FQ) no volume de 10 ml/kg, i.p. A morfina, administrada na dose 5 mg/kg, no volume de 10 ml/kg, i.p., foi usada como controle positivo. Decorrido o tempo máximo de 45 segundos, o animal que não reage deve ser retirado do teste e substituído, evitando desse modo a ocorrência de danos as suas patas. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada conforme descrito em 4.3.8.

***RESULTADOS***

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtenção da fração quinona de *A. oncocalyx*

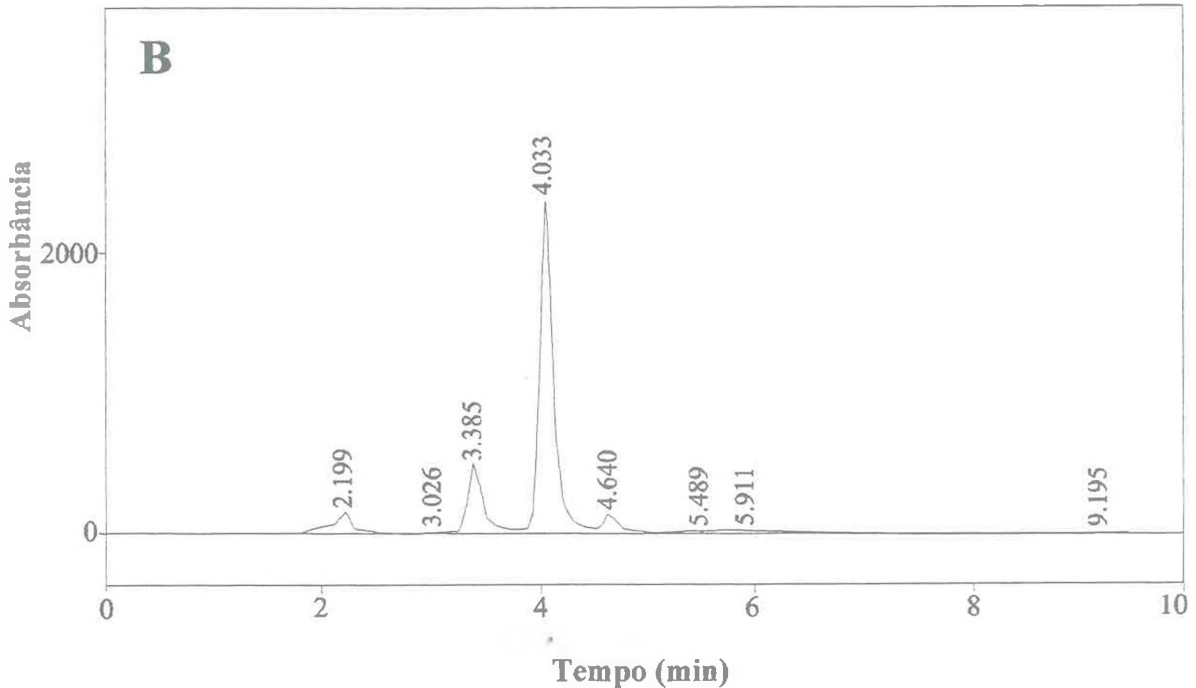
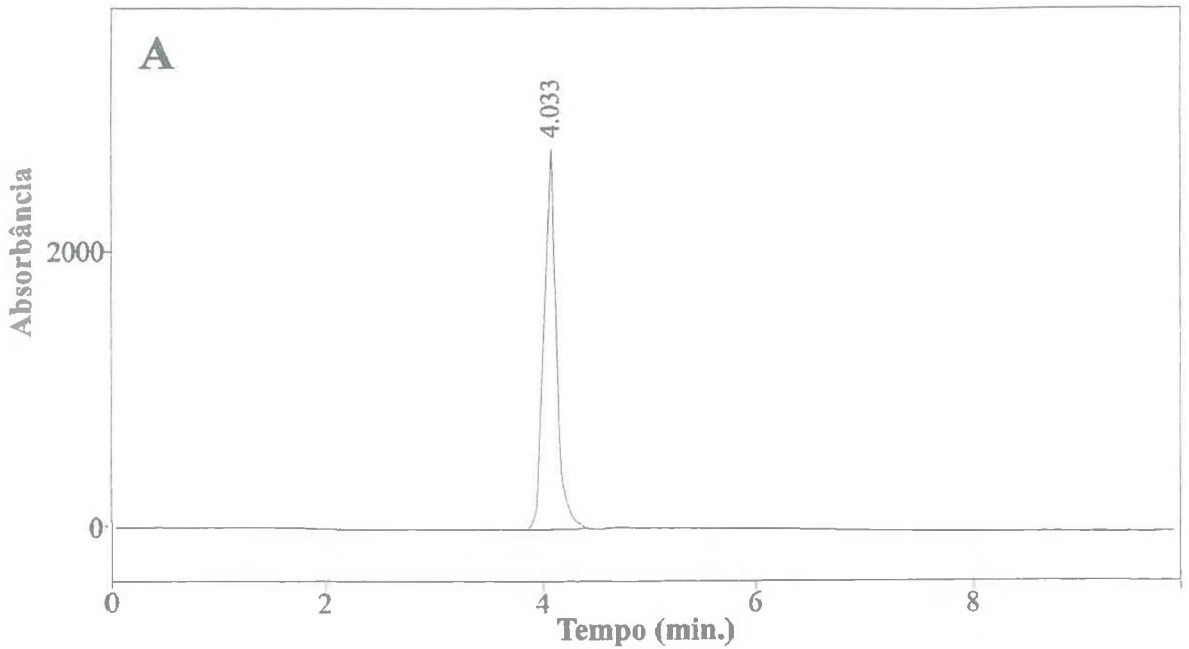
A obtenção da fração hidrossolúvel de *A. oncocalyx* e sua determinação qualitativa, utilizando a técnica de HPLC foram realizadas conforme descrito em 4.1. Os cromatogramas resultantes da análise das soluções de oncocalixona A e da fração hidrossolúvel por HPLC são apresentados nas **Figuras 7A e 7B**.

A **Figura 7A** mostra que o tempo de retenção da oncocalixona A foi de 4,03min e a **Figura 7B** revela que o principal componente, representando cerca de 80 % da fração hidrossolúvel, tem o tempo de retenção de 4,033 min., o qual é igual ao da oncocalixona A, devendo por isso tratar-se desse composto. Esse fato originou a denominação de fração quinona (FQ) dada à fração hidrossolúvel.

### 5.2 Avaliação da toxicidade aguda e de efeitos comportamentais da fração quinona *A. oncocalyx* em camundongos

A toxicidade aguda de FQ e seus efeitos, revelados por alterações no comportamento em camundongos, foram determinados seguindo o procedimento descrito em 4.2.

Os animais (em número de 10) do grupo tratado com FQ, na dose de 500 mg/kg, i.p. apresentaram diminuição da motilidade, com posterior ausência de movimento das patas traseiras (queda do trem posterior), que evoluiu para a imobilidade total. Nesse estado, os animais estavam conscientes e podiam responder a estímulos. As mortes, provavelmente devido à parada respiratória, ocorreram após a manifestação de depressão respiratória intensa. Após o tratamento, a primeira morte no grupo aconteceu com 35 min e decorridos 85 min, todos os animais haviam morrido; eles apresentavam o focinho e as patas escurecidos (anóxia). Os animais do grupo controle tiveram comportamento normal durante todo o período de observação (3 dias).



**FIGURAS - 7A (cromatograma da oncocalixona A) e 7B (cromatograma da fração hidrossolúvel de *Auxemma oncocalyx*).** As soluções de oncocalixona A e da fração, cada uma na concentração de 1 mg/ml em acetonitrila - água (1:1, v/v) e no volume de 20  $\mu$ l, foram injetadas separadamente no HPLC, operando a 280 nm, com coluna (YMC-Pack) C-18 (250,0 x 4,6 mm D.I. e partículas de 5  $\mu$ m), fase móvel acetonitrila - água (1:1, v/v), velocidade de fluxo de 1 ml/min e eluição isocrática à temperatura ambiente.

Nos grupos tratados com FQ nas doses de 400 e 300 mg/kg, i.p., a toxicidade aguda e a morte manifestaram-se como descrito anteriormente. No grupo que recebeu FQ 400 mg/kg, todos os animais ( $n = 10$ ) morreram durante o período de 72 min após o tratamento. No grupo tratado com FQ 300 mg/kg, 8 dos 10 animais morreram nas 6 primeiras horas que se seguiram ao tratamento; com 93 min 5 dessas mortes já haviam ocorrido. Os 2 animais restantes foram encontrados mortos 24 h depois da administração da fração. Os animais que serviram de controle para essas doses apresentaram comportamento normal durante todo o período de observação.

Dois experimentos foram realizados com FQ na dose de 200 mg/Kg, i.p. Em um deles, durante os 3 dias de observação após tratamento, 1 animal morreu com 80 min e decorridas 24 h, foram encontrados 8 mortos e um vivo. O sobrevivente teve comportamento normal em relação ao grupo controle. No outro experimento, durante o período de observação após o tratamento, 3 animais morreram no prazo de 95 min, 4 foram encontrados mortos com 24 h e 3 permaneceram vivos demonstrando comportamento normal em relação ao grupo controle.

FQ na dose de 150 mg/kg, i.p. também foi testada 2 vezes. Em ambos ensaios apenas 1 animal foi encontrado morto com 24 h após o tratamento. Os demais sobreviveram e apresentaram comportamento normal em relação ao grupo controle, durante o período de observação.

Nos animais dos grupos tratados com FQ nas doses de 100 e 50 mg/kg, i.p. nenhum efeito foi observado.

A **Tabela 1** mostra o número de mortes em um grupo de 10 animais, observadas com cada uma das doses de FQ testadas. Esses dados foram utilizados para a determinação dos valores da DL50 de FQ e de seus limites inferior e superior, conforme descrito em 4.2. A DL50 da fração quinona administrada por via intraperitoneal em camundongos foi 182,16 mg/kg (162,03 - 209,13).

Os animais dos grupos tratados com FQ nas doses de 500, 200, 150, 100 e 50 mg/kg, v. o. tiveram comportamento normal em relação a seus respectivos

**TABELA 1 - Número de mortes causadas por diferentes doses da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx***

<b>Grupo</b>	<b>Nº de mortes/nº total de animais</b>
Controle (DMSO 2 % em salina 10 ml/kg, i.p.)	0/10
FQ 500 mg/kg, i.p.	10/10
FQ 400 mg/kg, i.p.	10/10
FQ 300 mg/kg, i.p.	10/10
FQ 200 mg/kg, i.p.	8/10
FQ 150 mg/kg, i.p.	1/10

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com DMSO 2 % em salina (controle) ou FQ uma única vez, por via intraperitoneal. Para cada dose de FQ, foram registradas as mortes que ocorreram no grupo de animais (em número de 10), durante o período de 24 h após o tratamento. No caso das doses de 200 e 150 mg/kg os valores representam a média de 2 experimentos.



controles, durante o período de 3 dias de observação após o tratamento. Esses dados mostram que o valor da DL50 da fração quinona, administrada por via oral em camundongos é maior do que 500 mg/kg.

### 5.3 Determinação da atividade inibitória da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas *in vitro*

#### 5.3.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP

A ação inibitória da FQ, sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas: ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina, foi determinada segundo o procedimento descrito em 4.3.4.

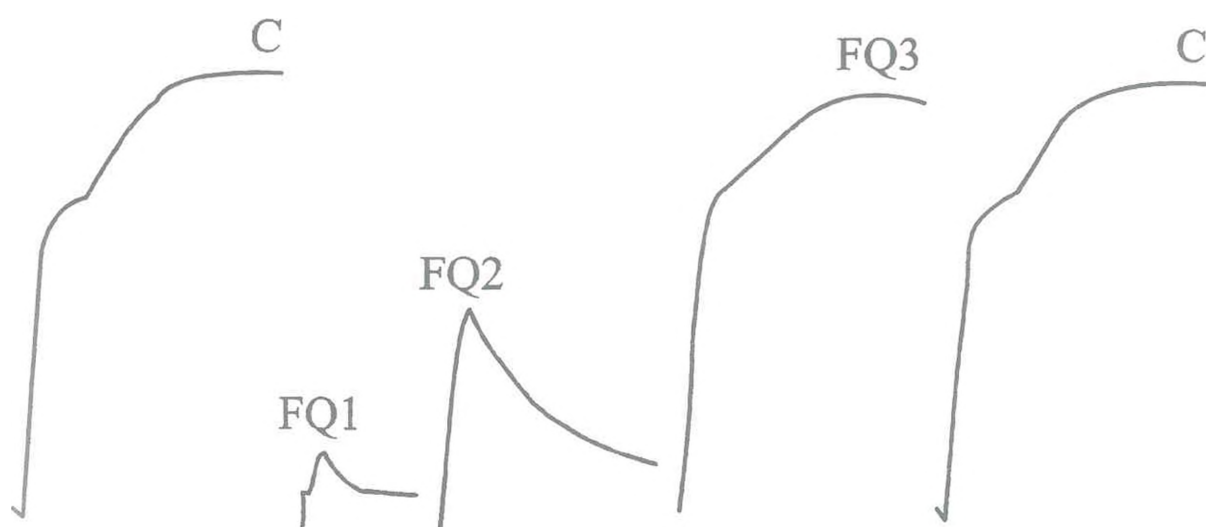
##### ⇒ ADP

A **Figura 8** mostra as curvas de agregação do ADP (controle) e na presença de FQ nas concentrações de 71,4, 35,7 e 17,8 µg/ml. A **Tabela 2** contem os valores da altura das curvas de agregação do ADP (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para amostras de sangue de 10 indivíduos. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.3.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa somente para as concentrações de FQ 35,7 e 71,4 µg/ml, em relação ao controle ( $p < 0,001$  - ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 2**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 9**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 7, 36 e 70 % para FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4 µg/ml respectivamente.

##### ⇒ Trombina

A **Figura 10** mostra as curvas da trombina (controle) e na presença de FQ nas concentrações de 71,4, 35,7 e 17,8 µg/ml. A **Tabela 3** contem os valores da altura das

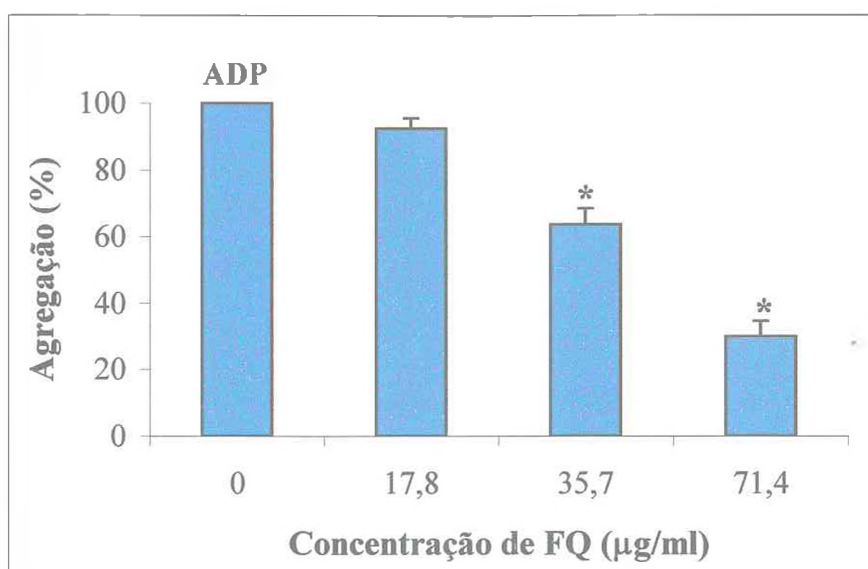


**FIGURA 8** - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, ADP 3 μM), FQ1 (71,4 μg/ml), FQ2 (35,7 μg/ml) e FQ3 (17,8 μg/ml).

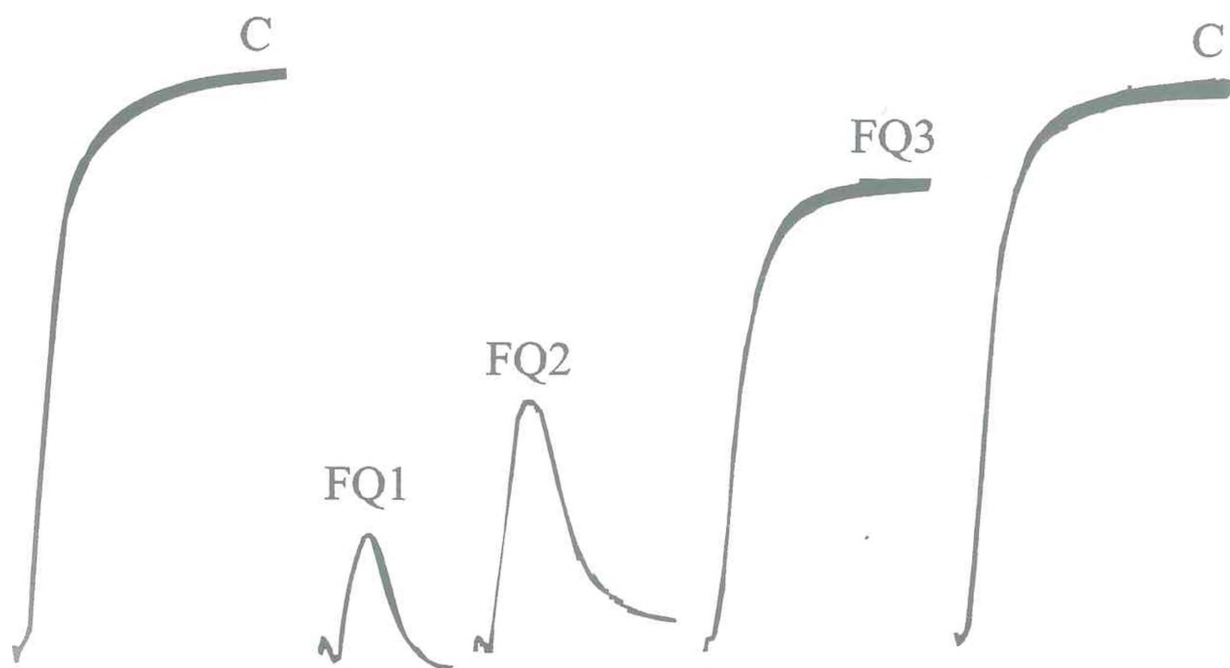
**TABELA 2 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	ADP	FQ (17,8 µg/ml)	FQ (35,7 µg/ml)	FQ (71,4 µg/ml)
1	14,1	12,8	11,2	2,4
2	11,3	11,3	9,1	4,7
3	8,5	5,9	4,5	0,9
4	11,8	11,6	10,6	3,7
5	10,4	8,5	5,1	2,6
6	12,5	11,6	5,9	1,4
7	13,4	13,1	9,1	5,3
8	13,1	12,3	7,6	6,1
9	8,4	8,4	5,1	4,3
10	13,2	13,2	6,9	3,4
Média ± EPM	11,7 ± 0,64	10,9 ± 0,77	7,5 ± 0,76*	3,5 ± 0,53*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de ADP (3 µM). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 9 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).** O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de ADP (3 µM). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 10 testes por coluna. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 10-** Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, trombina 3,04 U/ml), FQ1 (71,4 µg/ml), FQ2 (35,7 µg/ml) e FQ3 (17,8 µg/ml).

**TABELA 3 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	Trombina	FQ (17,8 µg/ml)	FQ (35,7 µg/ml)	FQ (71,4 µg/ml)
1	11,0	10,8	7,4	5,6
2	12,6	10,3	5,7	2,9
3	11,5	11,4	7,7	4,7
4	11,8	11,8	7,4	2,5
5	12,2	12,2	12,1	9,2
6	12,4	12,4	11,5	5,0
7	13,8	13,4	12,9	9,9
8	13,5	13,5	11,5	9,8
9	12,7	12,0	7,6	4,5
10	9,6	8,6	8,2	7,0
11	13,7	12,1	11,6	10,3
12	13,1	13,1	11,4	7,9
Média ± EPM	12,3 ± 0,35	11,8 ± 0,40	9,6 ± 0,71*	6,6 ± 0,80*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min antes da adição de trombina (3,04 U/ml). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

curvas de agregação da trombina (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para amostras de sangue de 12 indivíduos. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.3.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa somente para as concentrações de FQ 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle ( $p < 0,001$  - ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 3**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 11**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 4, 22 e 46 % para FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

#### ⇒**Colágeno**

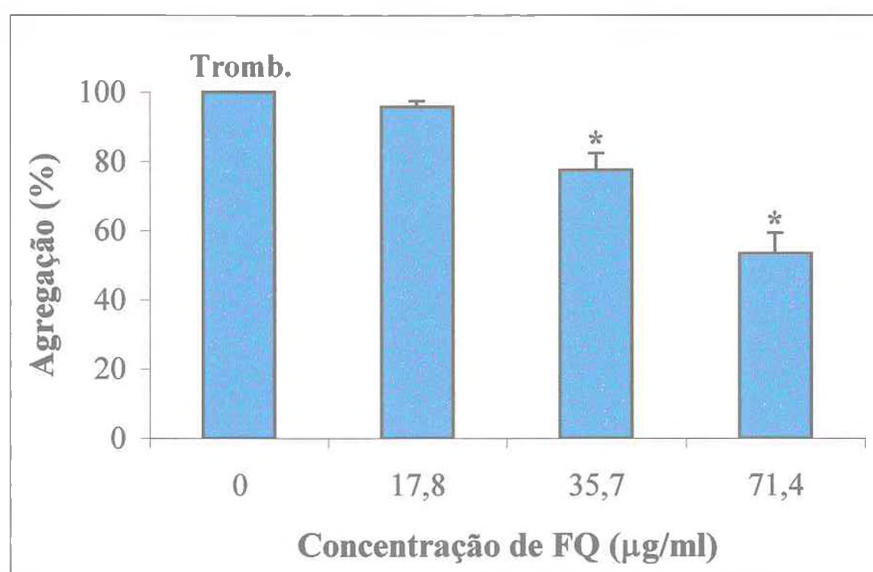
A **Figura 12** mostra as curvas do colágeno (controle) e na presença de FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ . A **Tabela 4** contem os valores da altura das curvas de agregação do colágeno (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para amostras de sangue de 10 indivíduos. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.3.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa somente para as concentrações de FQ 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle ( $p < 0,001$  - ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 4**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 13**). Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 3, 30 e 72 % para FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

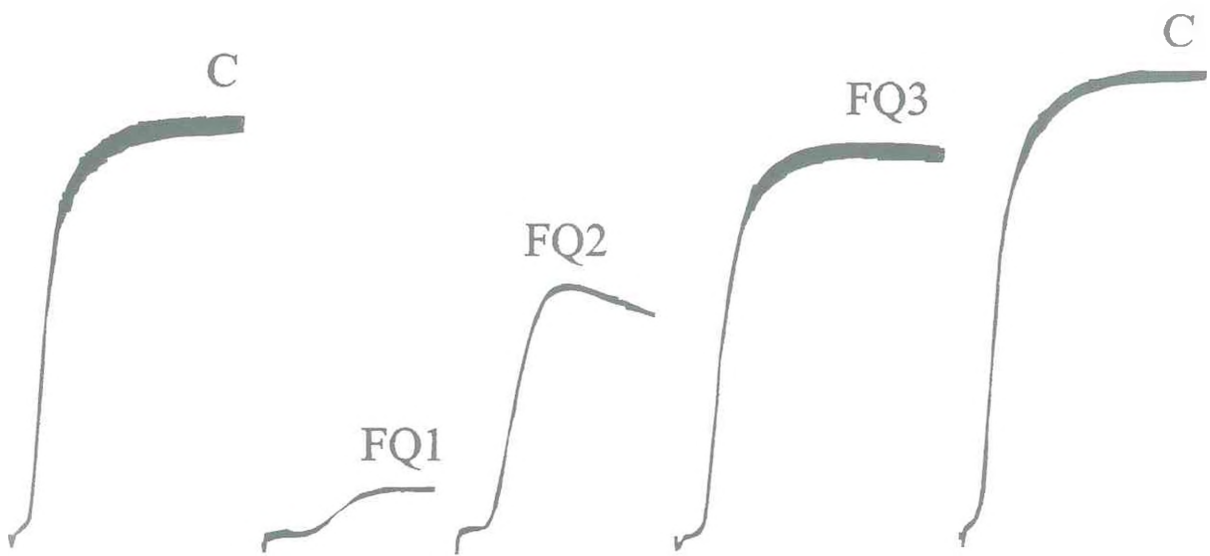
#### ⇒**Ácido araquidônico**

A **Figura 14** mostra as curvas do ácido araquidônico (controle) e na presença de FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ . A **Tabela 5** contem os valores da





**FIGURA 11** - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por trombina (Tromb.) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de tromb. (3,04 U/ml). Os valores, expressos em percentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 12 testes por coluna. \* $p < 0,001$  vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

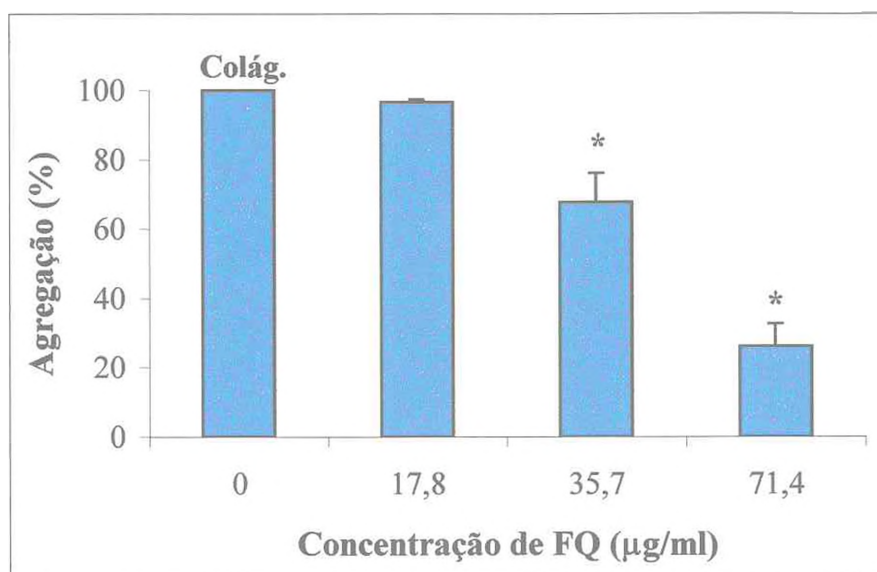


**FIGURA 12 - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, colágeno 2,86 µg/ml), FQ1 (71,4 µg/ml), FQ2 (35,7 µg/ml) e FQ3 (17,8 µg/ml).**

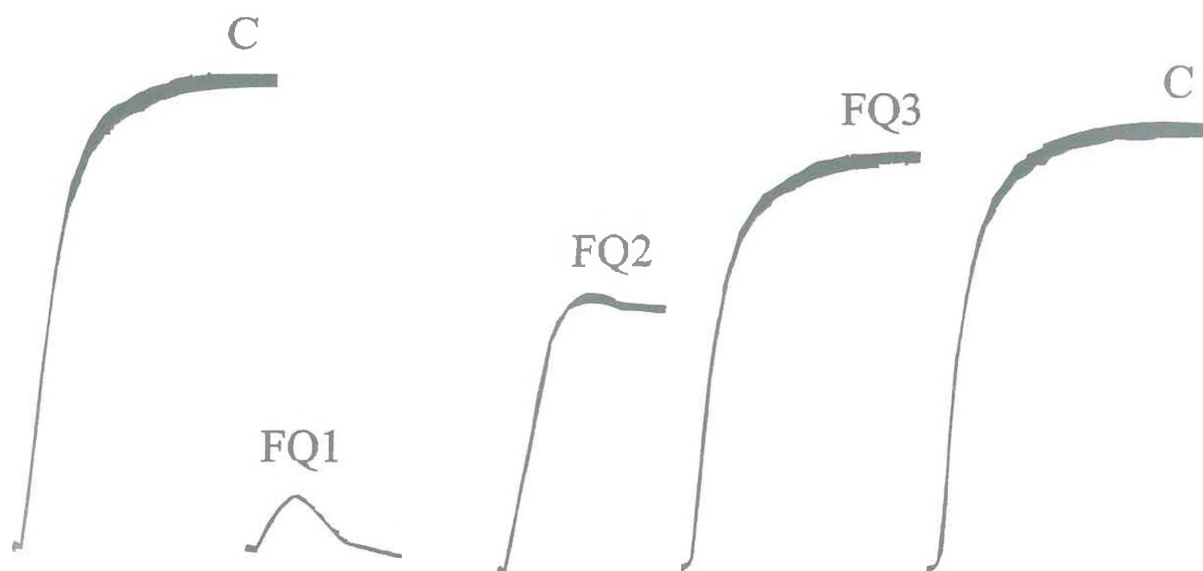
**TABELA 4 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	Colágeno	FQ (17,8 µg/ml)	FQ (35,7 µg/ml)	FQ (71,4 µg/ml)
1	9,0	8,6	2,1	0,5
2	10,9	10,9	2,3	0,8
3	11,0	10,5	9,5	0,5
4	11,9	11,0	10,7	5,3
5	11,9	11,6	7,4	1,2
6	13,4	13,4	11,9	4,1
7	12,8	12,4	9,8	4,3
8	14,7	14,1	12,8	7,2
9	13,7	13,5	11,2	8,5
10	12,7	12,0	7,7	1,6
Média ± EPM	12,2 ± 0,52	11,8 ± 0,52	8,5 ± 1,18*	3,4 ± 0,93*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de colágeno (2,86 µg/ml). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para as medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 13** - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno (Colág.) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de colág. (2,86 µg/ml). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 10 testes por coluna. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 14** - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, AA 285,7 µg/ml), FQ1 (71,4 µg/ml), FQ2 (35,7 µg/ml) e FQ3 (17,8 µg/ml).

**TABELA 5 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	AA	FQ (17,8 µg/ml)	FQ (35,7 µg/ml)	FQ (71,4 µg/ml)
1	11,3	11,1	7,4	1,6
2	11,2	11,2	8,9	4,6
3	12,4	12,4	5,7	1,6
4	11,9	11,9	9,9	0,4
5	12,8	12,1	10,7	6,4
6	13,1	12,5	11,4	6,7
7	13,6	13,2	12,6	11,2
8	13,2	13,1	12,3	11,1
9	12,6	12,6	8,4	6,1
10	13,8	13,3	12,3	6,4
11	11,7	11,6	1,5	0,5
Média ± EPM	12,5 ± 0,27	12,3 ± 0,23	9,19 ± 1,02*	5,1 ± 1,16*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de AA (285,7 µg/ml). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

altura das curvas de agregação do ácido araquidônico (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para amostras de sangue de 11 indivíduos. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.3.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa somente para as concentrações de FQ 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle ( $p < 0,001$  - ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 5**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 15**). Os valores de inibição expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 1, 26 e 59 % para FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

#### ⇒ Adrenalina

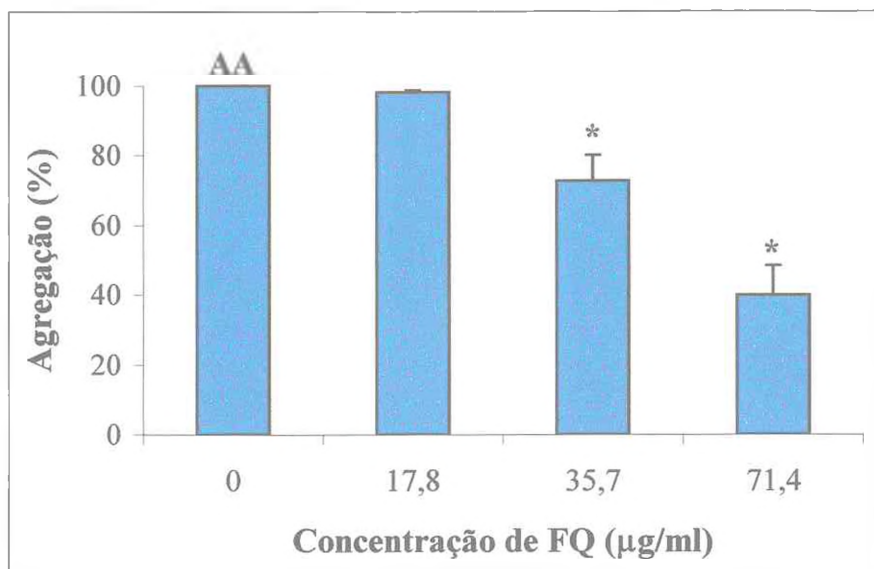
A **Figura 16** mostra as curvas da adrenalina (controle) e na presença de FQ nas concentrações de 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ . A **Tabela 6** contem os valores da altura das curvas de agregação da adrenalina (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para 6 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.3.4, demonstrou a ocorrência de diferença significativa para as concentrações de FQ 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 6**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 17**). Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 11, 69 e 90 % para FQ 17,8, 35,7 e 71,4  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

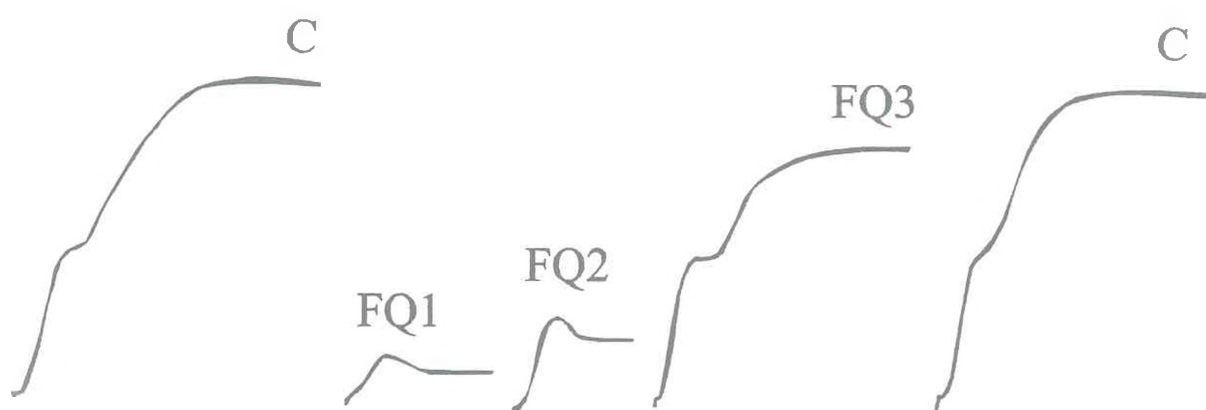
### 5.3.2 Determinação da concentração inibitória 50% da fração quinona para diferentes agonistas

Para os agonistas testados, os valores de CI50 de FQ e seus limites inferior e superior foram determinados conforme descrito em 4.3.5 e são mostrados na **Tabela 7**.





**FIGURA 15** – Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de AA (285,7 µg/ml). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 10 testes por coluna. \*p < 0,001 vs. o controle (ANOVA para medidas repetidas e teste de Tukey - Kramer).

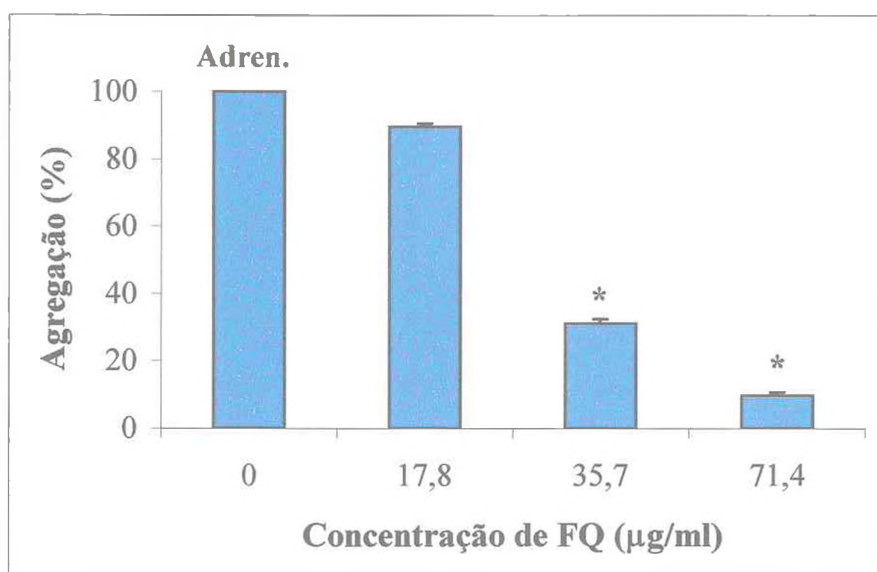


**FIGURA 16 - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina em plasma rico em plaquetas (PRP) pela fração quinona de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, adrenalina 23,45 µg/ml), FQ1 (71,4 µg/ml), FQ2 (35,7 µg/ml) e FQ3 (17,8 µg/ml).**

**TABELA 6 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina (Adren.) em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	Adren.	FQ (17,8 µg/ml)	FQ (35,7 µg/ml)	FQ (71,4 µg/ml)
1	11,6	10,0	4,1	1,5
2	10,4	9,6	3,2	0,8
3	11,1	9,9	3,2	1,3
4	10,4	9,2	3,6	1,1
5	9,8	8,7	2,9	0,9
6	9,2	8,5	2,5	0,6
Média ± EPM	10,4 ± 0,35	9,3 ± 0,25*	3,25 ± 0,23*	1,0 ± 0,14*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de adren. (23,45 µg/ml). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,05 vs. o controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 17 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por adrenalina (Adren.) em plasma rico em plaquetas (PRP).** O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição de adren. (23,45 µg/ml). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 6 testes por coluna. \*p < 0,05 vs. o controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 7 - Valores de CI50 da fração quinona de *Auxemma oncocalyx*, na inibição da agregação de plaquetas humanas induzida por diversos agonistas**

Agonista	CI50 FQ (µg/ml)
Trombina	93,76 (64,66 - 135,95) <sup>a</sup>
Ác. araquidônico	86,07 (59,36 - 124,81)
Adrenalina	67,93 (38,38 - 120,24)
Colágeno	56,57 (39,56 - 80,89)
ADP	53,85 (36,38 - 79,70) <sup>b</sup>

Os valores representam a concentração inibitória 50 % (CI50) de FQ e seus limites inferior e superior, para cada um dos agonistas testados. A análise quantal de Litchfield e Wilcoxon, utilizada como procedimento estatístico, revelou a ocorrência de diferença significativa de b vs. a.

As inclinações das diferentes retas foram calculadas como especificado em 4.3.5, sendo seus valores: 2,18 (1,23 - 3,86) para o ADP; 2,26 (1,22 - 4,18) para a trombina; 2,05 (1,25 - 3,36) para o colágeno; 2,18 (1,27 - 3,75) para o ácido araquidônico e 2,41 (0,96 - 6,07) para a adrenalina. Os testes realizados indicaram que essas retas são paralelas; conseqüentemente foi possível comparar entre si, os valores de CI50 de FQ. Embora a CI50 de FQ frente ao ADP seja menor do que com os demais agonistas, a análise estatística revelou a ocorrência de diferença significativa somente para o ADP em relação à trombina, indicando que ao inibir a agregação de plaquetas humanas, FQ mostrou-se mais potente frente ao ADP do que com a trombina e o valor da razão de potência foi 1,74 (análise quantal de Litchifield e Wilcoxon).

### **5.3.3 Avaliação da influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária pela fração quinona**

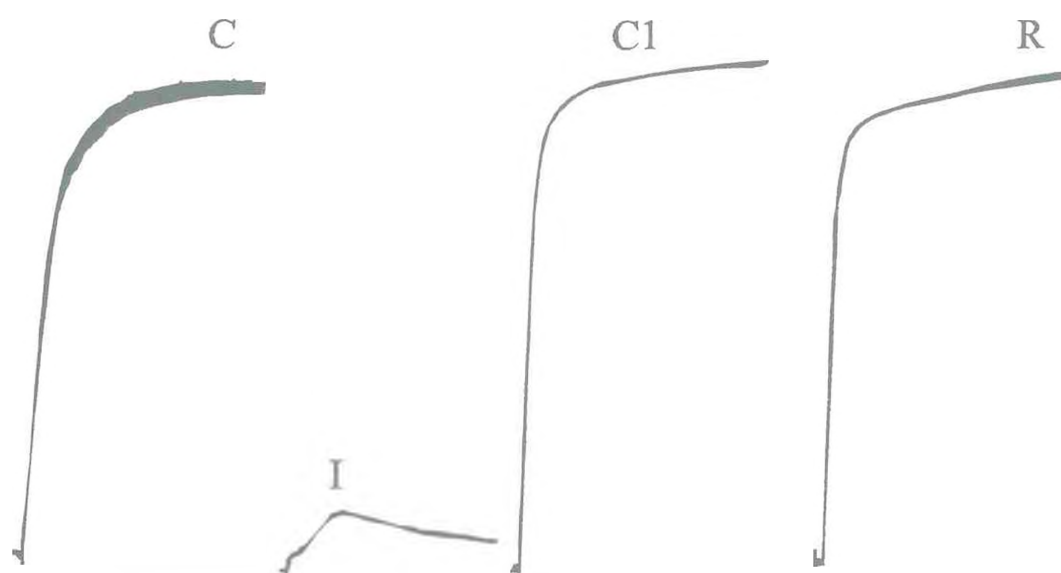
A influência do tempo de incubação do PRP com FQ, sobre a inibição da agregação plaquetária, foi avaliada segundo o procedimento descrito em 4.3.6.

Os resultados obtidos mostraram que o aumento do tempo de incubação, não causou inibição da agregação de plaquetas humanas, mais pronunciada do que aquela observada com 5 min. Isto ocorreu para todos os agonistas testados, ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina.

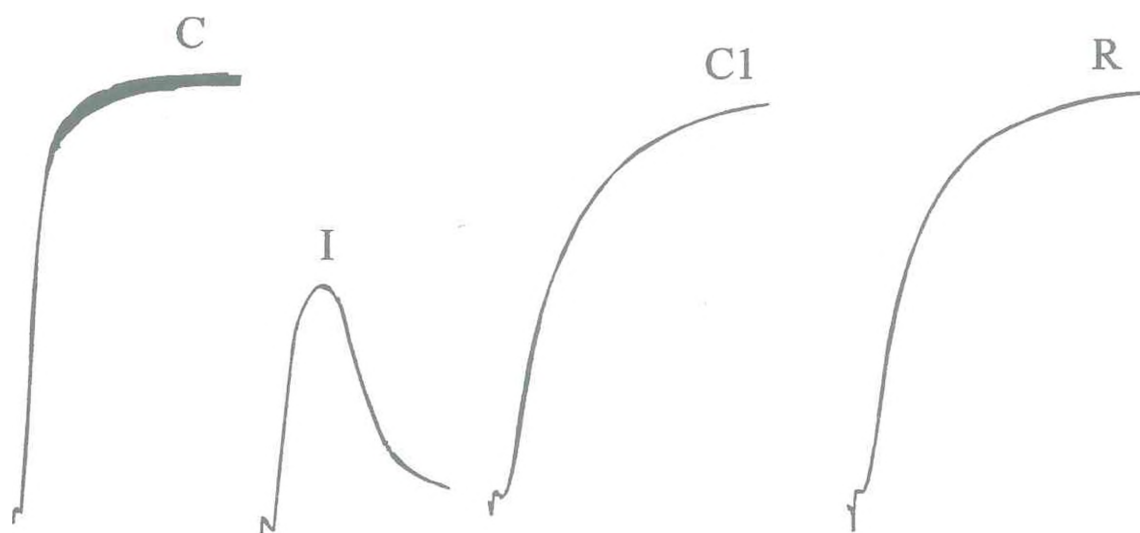
### **5.3.4 Avaliação das plaquetas quanto a sua capacidade de agregar novamente após a inibição pela fração quinona**

A restauração da capacidade de agregação das plaquetas, após a sua inibição por FQ, foi avaliada segundo o procedimento descrito em 4.3.7.

Os resultados obtidos mostraram que plaquetas humanas depois de inibidas, tiveram a sua capacidade de agregação restaurada, após a lavagem para a retirada de FQ do meio de reação e posterior indução da agregação pelo agonista. As **Figuras 18 e 19** ilustram esse fato.



**FIGURA 18** – Gráfico representativo da restauração da capacidade de agregação de plaquetas humanas após a sua inibição pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* utilizando o ácido araquidônico (AA 285,7 µg/ml) como agonista. C (controle, AA em PRP), I (AA em 450 µl de PRP + FQ 71,4 µg/ml), C1 (controle, AA em suspensão de plaquetas lavadas), R (AA em 450 µl de suspensão de plaquetas lavadas, após a sua inibição por FQ 71,4 µg/ml).



**FIGURA 19** – Gráfico representativo da restauração da capacidade de agregação de plaquetas humanas após a sua inibição pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* utilizando a trombina (3,04 U/ml) como agonista. C (controle, trombina em PRP), I (trombina em 450 µl de PRP + FQ 71,4 µg/ml), C1 (controle, trombina em suspensão de plaquetas lavadas), R (trombina em 450 µl de suspensão de plaquetas lavadas, após a sua inibição por FQ 71,4 µg/ml).



### 5.3.5 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da aspirina sobre a agregação plaquetária

A potencialização por FQ da ação inibitória da aspirina sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em PRP, foi determinada segundo o procedimento descrito 4.3.8.

A **Tabela 8** mostra os valores da altura das curvas de agregação do AA (controle), aspirina, FQ e FQ na presença de aspirina, medidas como especificado em 4.3.4, para 3 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada como descrito em 4.3.8, mostrou que houve diferença significativa para o grupo aspirina + FQ, em relação ao grupo aspirina ou FQ sozinhas ( $p < 0,001$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 8**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 20**). Esses resultados demonstram que de modo significativo, FQ causou a potencialização do efeito inibitório da aspirina sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico em PRP. Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 10, 11 e 100 % para os grupos aspirina 25  $\mu\text{M}$ , FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  e aspirina 25  $\mu\text{M}$  + FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

### 5.3.6 Determinação da potencialização pela fração quinona da ação inibitória da pentoxifilina sobre a agregação plaquetária

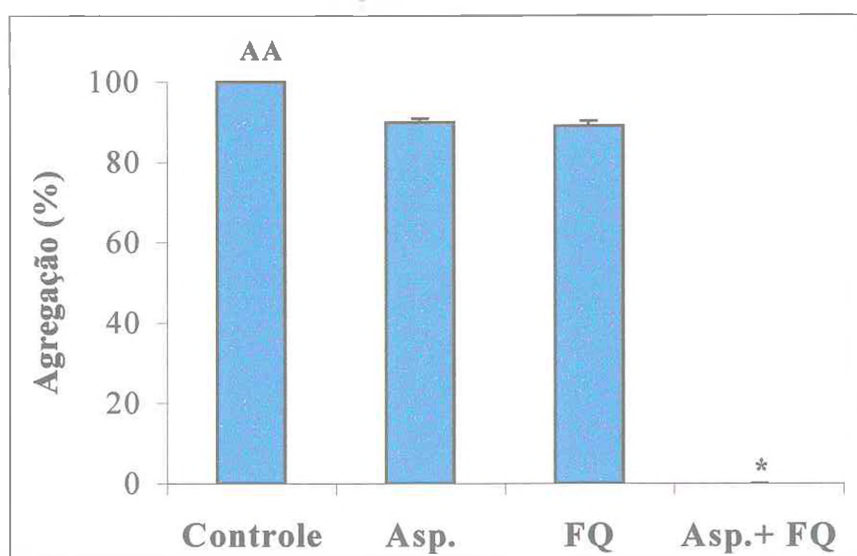
A potencialização por FQ da ação inibitória da pentoxifilina sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em PRP, foi determinada segundo o procedimento descrito em 4.3.9.

A **Tabela 9** mostra os valores da altura das curvas de agregação do ADP (controle), PTX, FQ e FQ na presença de PTX, medidas como especificado em 4.3.4, para 10 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada como descrito em 4.3.9, mostrou que houve diferença significativa para o grupo PTX + FQ,

**TABELA 8 - Potencialização pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* da ação inibitória da aspirina sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	AA	Aspirina (25,0 $\mu$ M)	FQ (17,8 $\mu$ g/ml)	Aspirina + FQ
1	9,9	8,7	8,6	0,0
2	10,7	9,7	9,6	0,0
3	11,2	10,2	10,1	0,0
Média $\pm$ EPM	10,6 $\pm$ 0,38	9,5 $\pm$ 0,44	9,4 $\pm$ 0,44	0,0 $\pm$ 0,00*

O PRP (450  $\mu$ l) foi incubado com a aspirina ou FQ a 37 °C, por 5 min e a agregação foi induzida pelo AA (285,7  $\mu$ g/ml). Nos experimentos realizados com FQ na presença de aspirina, essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com a aspirina. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do agonista. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução da aspirina e FQ. Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o grupo aspirina ou FQ sozinhas (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 20 -** Potencialização pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* da ação inibitória da aspirina (Asp.) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ácido araquidônico (AA) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450  $\mu$ l) foi incubado com asp. 25  $\mu$ M ou FQ 17,8  $\mu$ g/ml a 37  $^{\circ}$ C, por 5 min e a agregação foi induzida pelo AA (285,7  $\mu$ g/ml). Nos experimentos realizados com FQ na presença da asp., essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com a asp. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do AA. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução da asp. e FQ. Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média  $\pm$  EPM de 3 testes por grupo. \* $p < 0,001$  vs. o grupo asp. ou FQ sozinhas (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 9 - Potencialização pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* da ação inibitória da pentoxifilina (PTX) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	ADP 3 $\mu$ M	PTX (222,2 $\mu$ g/ml)	FQ (17,8 $\mu$ g/ml)	PTX + FQ
1	9,3	8,6	8,4	4,0
2	9,8	8,5	9,4	5,3
3	9,9	8,6	9,6	4,0
4	10,4	9,8	9,6	5,1
5	10,6	9,6	9,3	5,8
6	9,9	8,8	9,2	5,4
7	10,1	9,5	9,3	5,8
8	9,0	8,6	8,7	4,5
9	10,5	9,7	9,5	4,7
10	9,9	8,9	9,3	6,3
Média $\pm$ EPM	9,9 $\pm$ 0,16	9,1 $\pm$ 0,17	9,2 $\pm$ 0,12	5,1 $\pm$ 0,25*

O PRP (450  $\mu$ l) foi incubado com PTX ou FQ por 5 min a 37 °C e a agregação foi induzida por ADP. Nos experimentos realizados com FQ na presença de PTX, essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com PTX. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do agonista. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução de PTX e FQ. Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 vs. o grupo, PTX ou FQ sozinhos (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

em relação aos grupo PTX ou FQ sozinhos ( $p < 0,001$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

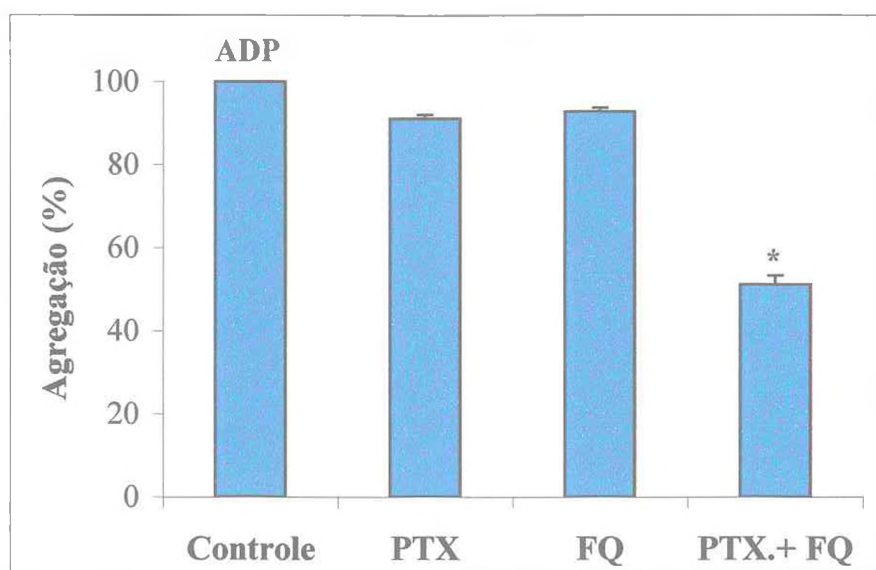
Os dados da **Tabela 9**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 21**). Esses resultados demonstram que de modo significativo, FQ causou a potencialização do efeito inibitório de PTX sobre a agregação de plaquetas humanas induzida pelo ADP em PRP. Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 9, 7 e 49 % para os grupos PTX 222,2  $\mu\text{g/ml}$ , FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  e PTX 222,2  $\mu\text{g/ml}$  + FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

### 5.3.7 Determinação da ação da fração quinona sobre a inibição da agregação plaquetária causada pela L-arginina

A ação da FQ sobre a inibição causada pela L-arg. da agregação de plaquetas humanas, induzida por colágeno em PRP foi determinada a partir das curvas de agregação obtidas seguindo o procedimento descrito em 4.3.10.

A **Tabela 10** mostra os valores da altura das curvas de agregação do colágeno (controle), L-arg., FQ e FQ na presença de L-arg., medidas como especificado em 4.3.4, para 8 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada como descrito em 4.3.10, mostrou que não houve diferença significativa para o grupo L-arg. + FQ, em relação ao grupo L-arg. sozinha ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Os dados apresentados na **Tabela 10**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 22**). Esses resultados demonstram que FQ não produziu nenhum efeito significativo sobre a inibição causada pela L-arg., da agregação de plaquetas humanas, induzida por colágeno em PRP. Os valores médios de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 8, 3 e 13 % para os grupos L-arg. 2,7  $\text{mg/ml}$ , FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  e L-arg. 2,7  $\text{mg/ml}$  + FQ 17,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.



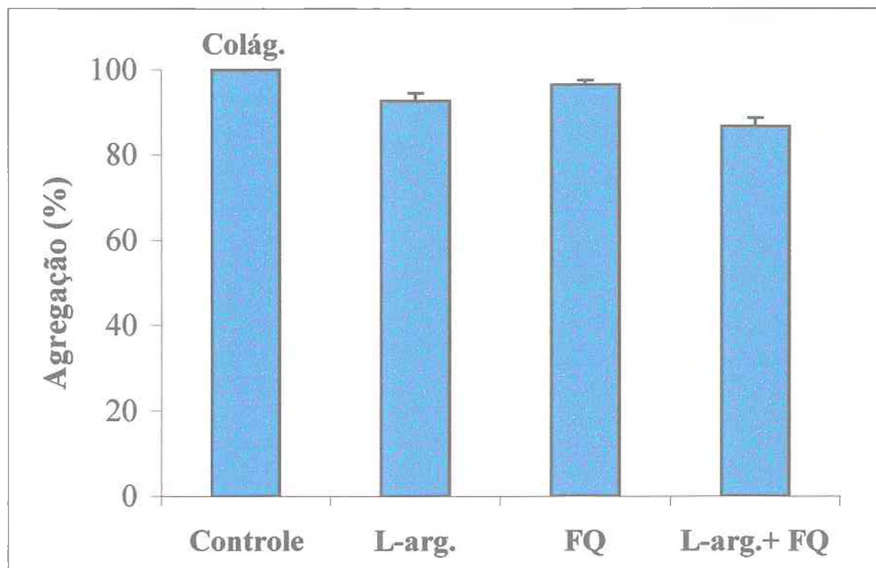
**FIGURA 21 -** Potencialização pela fração quinona (FQ) de *Auxemma oncoalyx* da ação inibitória da pentoxifilina (PTX) sobre a agregação de plaquetas humanas induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450  $\mu$ l) foi incubado com PTX 222,2  $\mu$ g/ml ou FQ 17,8  $\mu$ g/ml a 37  $^{\circ}$ C, por 5 min e a agregação foi induzida por ADP (3  $\mu$ M). Nos experimentos realizados com FQ na presença de PTX, essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com PTX. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do ADP. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução de PTX e FQ. Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média  $\pm$  EPM de 10 testes por grupo. \*p < 0,001 vs. o grupo PTX ou FQ sozinhos (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 10 - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a inibição causada pela L-arginina (L-arg.) da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno em plasma rico em plaquetas (PRP)**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)			
	Colágeno	L-arg. 2,7 mg/ml	FQ 17,8 µg/ml	L-arg. + FQ
1	10,9	9,9	10,0	9,7
2	10,4	9,4	10,2	8,2
3	10,3	9,7	10,3	8,3
4	11,6	10,1	10,8	10,5
5	11,0	9,4	10,9	9,4
6	10,6	10,5	10,1	9,5
7	10,2	10,2	10,0	9,7
8	10,0	9,5	9,7	8,5
Média EPM	10,6 ± 0,18	9,8 ± 0,14	10,3 ± 0,15	9,2 ± 0,29

O PRP (450 µl) foi incubado com L-arg. ou FQ por 5 min a 37 °C e a agregação foi induzida por colágeno (2,86 µg/ml). Nos experimentos realizados com FQ na presença de L-arg., essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com L-arg. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do agonista. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução da L-arg. e FQ. Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. Não houve diferença significativa para o grupo L-arg. + FQ em relação a L-arg. sozinha ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).





**FIGURA 22** - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a inibição causada pela L-arginina (L-arg.) da agregação de plaquetas humanas induzida por colágeno (colág.) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450  $\mu$ l) foi incubado com L-arg. 2,7 mg/ml ou FQ 17,8  $\mu$ g/ml a 37 °C, por 5 min e a agregação foi induzida por colágeno (2,86  $\mu$ g/ml). Nos experimentos realizados com FQ na presença de L-arg., essa fração foi acrescentada após 5 min de incubação do PRP com L-arg. A incubação foi então mantida por mais 5 min, antes da adição do colágeno. Desse mesmo modo o controle foi obtido, exceto que o PRP foi incubado com os veículos de dissolução de L-arg. e FQ. Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação) representam a média  $\pm$  EPM de 8 testes por grupo. Não houve diferença significativa para o grupo L-arg. + FQ, em relação ao grupo L-arg. sozinha. ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

## 5.4 Determinação da atividade inibitória da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas de rato *in vitro*

### 5.4.1 Inibição da agregação plaquetária induzida por diferentes agonistas em PRP

A atividade inibitória da FQ, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina, foi determinada segundo o procedimento descrito em 4.4.3.

#### ⇒ ADP

A **Figura 23** mostra as curvas referentes a FQ nas concentrações de 177,8 e 88,9  $\mu\text{g/ml}$ , entre curvas do ADP (controle). A **Tabela 11** mostra os valores da altura das curvas de agregação do ADP (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado em 4.3.4, para 6 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.4.3, demonstrou a ocorrência de diferença significativa para as concentrações de FQ 88,9 e 177,8  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle ( $p < 0,01$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Os dados da **Tabela 11**, convertidos em valores de porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 24**). Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, foram 27 e 70 % para FQ 88,9 177,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

#### ⇒ Trombina

A **Figura 25** mostra as curvas referentes a FQ nas concentrações de 177,8 e 88,9  $\mu\text{g/ml}$ , entre curvas da trombina (controle). A **Tabela 12** mostra os valores da altura das curvas de agregação da trombina (controle) e das diferentes concentrações de FQ, medidas como especificado 4.3.4, para 6 “pools” de PRP diferentes. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.4.3, demonstrou a ocorrência de diferença significativa para as concentrações de FQ 88,9 e 177,8  $\mu\text{g/ml}$ , em relação ao controle. ( $p < 0,001$ - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

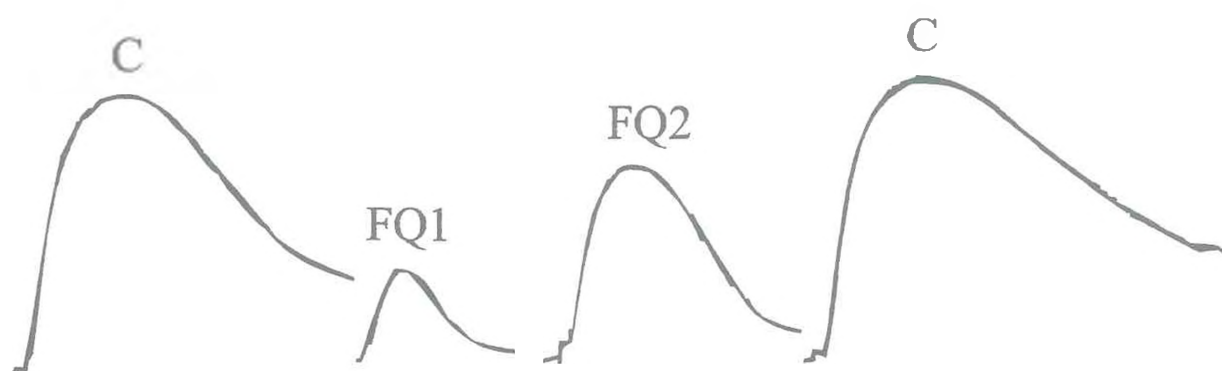
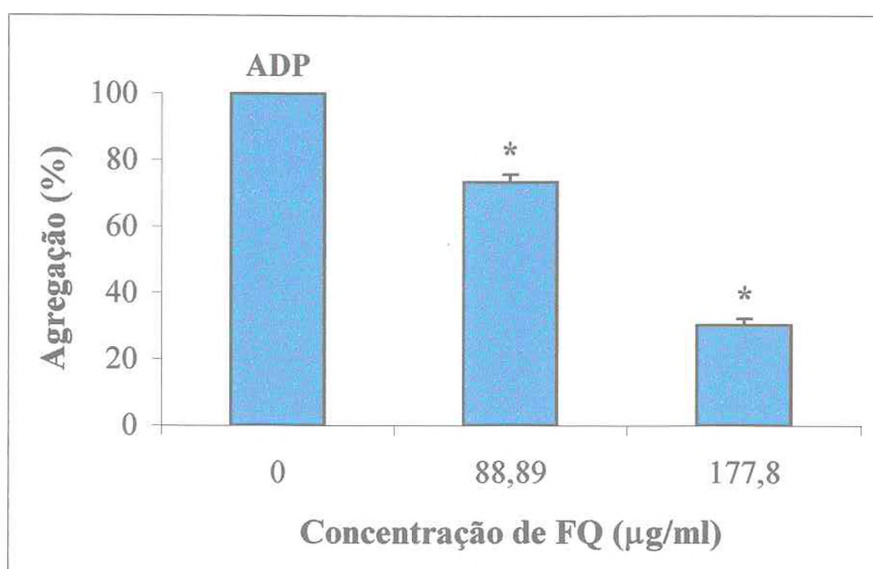


FIGURA 23 - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas de rato induzida pelo ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) por diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, ADP 20 μM ), FQ1 (177,8 μg/ml), FQ2 (88,9 μg/ml).

**TABELA 11 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP) *in vitro***

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)		
	ADP	FQ (177,8 µg/ml)	FQ (88,9 µg/ml)
1	4,7	1,1	3,2
2	5,7	1,8	4,0
3	5,5	1,5	3,9
4	6,1	1,9	4,5
5	5,8	1,8	4,3
6	6,2	2,3	5,2
Média ± EPM	5,7 ± 0,22	1,7 ± 0,16*	4,2 ± 0,27*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição do ADP (20 µM). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,01 vs. o controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 24 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por ADP em plasma rico em plaquetas (PRP).** O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição do ADP (20 µM). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 6 testes por coluna. \*p < 0,01 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

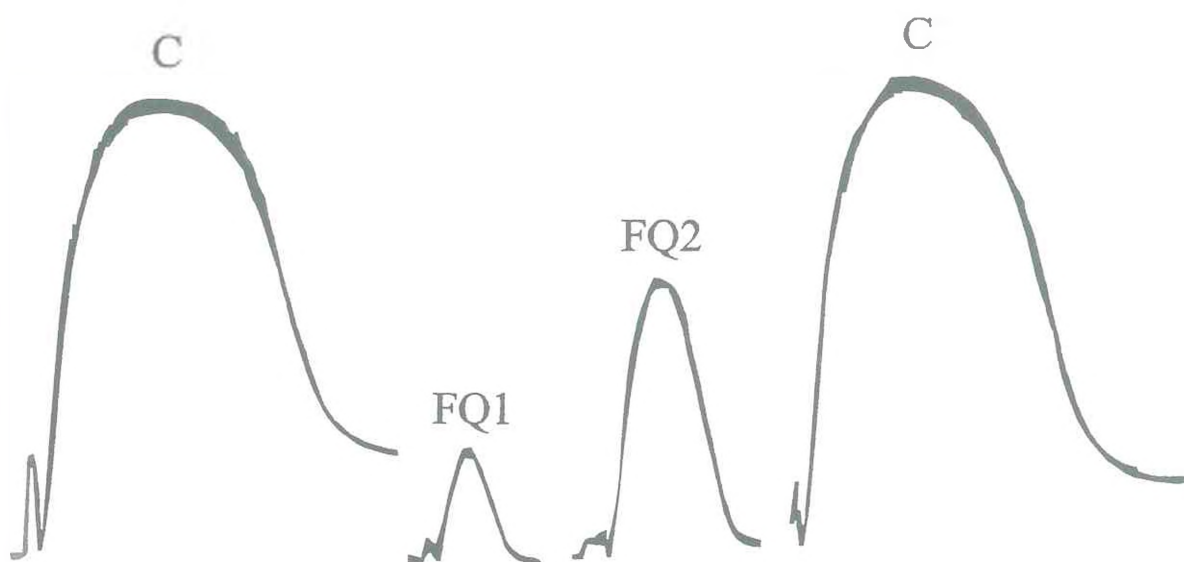


FIGURA 25 - Gráfico representativo da inibição da agregação de plaquetas de rato induzida pela trombina em plasma rico em plaquetas (PRP) por diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*. C (controle, trombina 15,8 U/ml), FQ1 (177,8  $\mu\text{g/ml}$ ) e FQ2 (88,9  $\mu\text{g/ml}$ ).

**TABELA 12 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por trombina em plasma rico em plaquetas (PRP), *in vitro***

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)		
	Trombina	FQ 177,8 µg/ml	FQ 88,9 µg/ml
1	8,4	2,8	6,2
2	6,8	1,6	4,6
3	7,9	2,5	6,0
4	7,7	2,3	5,6
5	7,4	1,9	5,1
6	7,0	2,3	5,0
Média ± EPM	7,5 ± 0,24	2,2 ± 0,17*	5,4 ± 0,25*

O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição da trombina (15,8 U/ml). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. \*p < 0,001 v.s. o controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



Os dados da **Tabela 12**, convertidos em valores de percentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foram utilizados na construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 26**). Os valores de inibição, expressos em percentagem em relação ao controle, foram 28 e 71 % para FQ 88,9 e 177,8  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente.

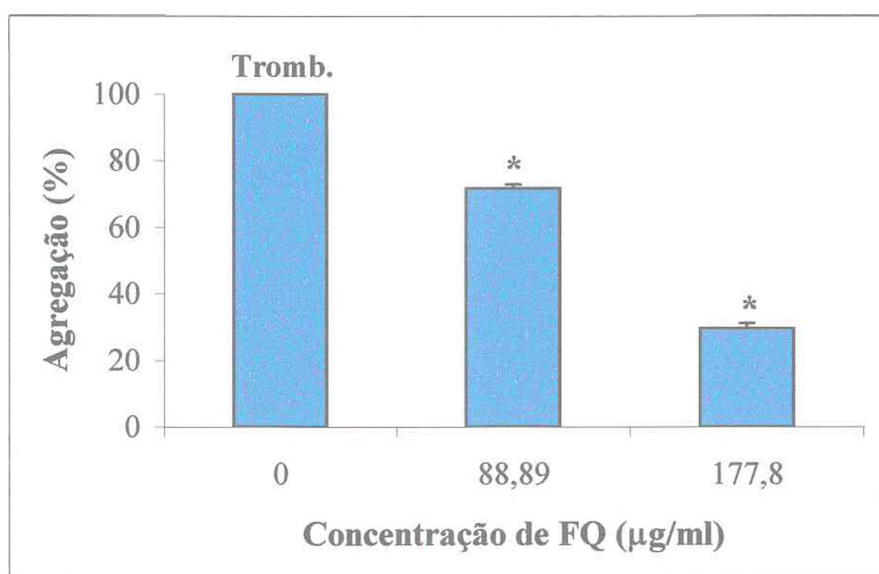
### 5.5 Determinação da atividade da fração quinona de *A. oncostylyx* administrada pela via intraperitoneal sobre a agregação de plaquetas em ratos

A ação inibitória da FQ, administrada nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg, i.p., sobre a agregação plaquetária em ratos, foi determinada a partir das curvas de agregação obtidas segundo o procedimento descrito em 4.5.

A **Tabela 13** mostra os valores médios da altura das curvas de agregação (em duplicata) dos grupos controle e tratado com FQ na dose de 10 mg/kg, medidas como especificado em 4.3.4. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.5, mostrou que não houve diferença significativa para o grupo tratado com FQ 10 mg/kg, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - teste  $t$  não pareado). Os dados da **Tabela 13** foram convertidos em valores de percentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação) e a média  $\pm$  EPM de 4 experimentos foram  $96,6 \pm 0,83$  % para FQ 10 mg/kg.

A **Tabela 14** mostra os valores médios da altura das curvas de agregação (em duplicata) dos grupos controle e tratados com FQ 30 e 60 mg/kg. A análise estatística dos dados revelou que não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ 30 e 60 mg/kg, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Krumer). Os dados da **Tabela 14** foram convertidos em valores de percentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação) e as médias  $\pm$  EPM de 4 experimentos foram  $97,3 \pm 1,31$  e  $97,9 \pm 1,00$  % para FQ nas doses de 30 e 60 mg/kg respectivamente.

Esses resultados demonstram que FQ administrada nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg, i.p., 1 vez ao dia, durante 5 dias em ratos, não produziu nenhum efeito



**FIGURA 26 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a agregação de plaquetas de rato induzida por trombina (Tromb.) em plasma rico em plaquetas (PRP). O PRP (450 µl) foi incubado com salina (controle) ou FQ a 37 °C, por 5 min, antes da adição da tromb. (15,8 U/ml). Os valores, expressos em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), representam a média ± EPM de 6 testes por coluna. \*p < 0,001 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).**

**TABELA 13 - Avaliação da resposta de plaquetas ao ADP, em plasma rico em plaquetas de ratos pré-tratados com a fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*.**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)	
	ADP	FQ (10 mg/kg, i.p.)
1	6,8	6,6
2	7,0	6,9
3	7,4	7,0
4	8,0	7,7
Média ± EPM	7,3 ± 0,26	7,1 ± 0,23

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g), em número de 6 por grupo foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) e FQ por via intraperitoneal, 1 vez ao dia, durante 5 dias. No 5º dia o sangue dos animais foi colhido 30 min após o tratamento. Em PRP (450 µl) de um “pool” obtido para cada um dos grupos, a agregação foi induzida por ADP 20 µM. Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. Não houve diferença significativa para o grupo tratado com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - teste  $t$  não pareado).

**TABELA 14 - Avaliação da resposta de plaquetas ao ADP, em plasma rico em plaquetas (PRP) de ratos pré-tratados com a fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx*.**

Ensaio	Altura da curva de agregação (cm)		
	ADP	FQ (30 mg/kg, i.p.)	FQ (60 mg/kg, i.p.)
1	8,0	7,7	7,9
2	8,2	8,2	8,0
3	8,5	8,0	8,1
4	7,9	7,8	7,9
Média ± EPM	8,2 ± 0,13	7,9 ± 0,11	8,0 ± 0,05

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g), em número de 6 por grupo foram utilizados. Os animais foram tratados com DMSO 2 % em salina (controle) ou FQ por via intraperitoneal, 1 vez ao dia, durante 5 dias. No 5º dia o sangue dos animais foi colhido 30 min após o tratamento. Em PRP (450 µl) de um "pool" obtido para cada um dos grupos, a agregação foi induzida por ADP (20 µM). Os valores representam a altura das curvas de agregação em centímetros. Não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Krumer).

significante sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP, obtido a partir de amostras de sangue colhidas dos animais no 5º dia, com 30 min após a última injeção de FQ.

#### **5.6 Avaliação da administração oral por tempo prolongado da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a agregação plaquetária e parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue em ratos**

O efeito da administração de FQ por tempo prolongado, sobre a agregação plaquetária e parâmetros hematológicos e bioquímicos em ratos, foi avaliado segundo o procedimento descrito em 4.6.

A **Tabela 15** mostra os valores (média  $\pm$  EPM de 6 animais) dos parâmetros hematológicos analisados antes e no final do tratamento, referentes aos grupos controle e tratado com FQ. A análise estatística dos dados revelou que, para todos os parâmetros hematológicos determinados no final do tratamento, não houve diferença significativa para o grupo que recebeu FQ, em relação ao controle ( $p > 0,05$  - ANOVA).

A **Tabela 16** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) dos parâmetros bioquímicos analisados antes e no final do tratamento, referentes aos grupos controle e tratado com FQ. A análise estatística dos dados revelou que para todos os parâmetros bioquímicos determinados no final do tratamento, não houve diferença significativa para o grupo que recebeu FQ, em relação ao controle ( $p > 0,05$  - ANOVA).

O efeito de FQ sobre as plaquetas foi determinado a partir das curvas de agregação obtidas no 7º e 15º dia do tratamento, conforme descrito em 4.6. No 7º dia, o valor médio da altura das curvas de agregação (em duplicata), medidas como especificado em 4.3.4, foi 6,3 cm tanto para os grupos controle quanto para o tratado com FQ. Conseqüentemente o valor, expresso em porcentagem de agregação em relação ao controle (100 % de agregação), foi 100 % para o grupo tratado com FQ. No final do tratamento os valores médios da altura das curvas de agregação (em duplicata) foram 7,2 e 7,1 cm para os grupos controle e tratado com FQ

**TABELA 15 - Atividade da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre parâmetros hematológicos em ratos**

Parâmetro	Grupo			
	Controle (A.T.)	Controle (F.T.)	Tratado (A.T.)	Tratado (F.T.)
Hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7,5 $\pm$ 0,10	6,5 $\pm$ 0,21	7,6 $\pm$ 0,10	6,6 $\pm$ 0,23
Hemoglobina (g/dl)	14,8 $\pm$ 0,19	14,6 $\pm$ 0,54	14,9 $\pm$ 0,14	14,7 $\pm$ 0,57
Hematócrito (%)	46,3 $\pm$ 0,64	43,1 $\pm$ 1,61	46,5 $\pm$ 0,52	44,3 $\pm$ 1,18
VCM (fl)	61,3 $\pm$ 0,43	67,1 $\pm$ 0,40	61,7 $\pm$ 0,32	67,0 $\pm$ 1,06
HCM (pg)	19,6 $\pm$ 0,11	22,3 $\pm$ 0,17	19,7 $\pm$ 0,14	22,2 $\pm$ 0,12
CHCM (g/dl)	32,0 $\pm$ 0,07	33,3 $\pm$ 0,20	32,0 $\pm$ 0,23	33,2 $\pm$ 0,55
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	600,2 $\pm$ 26,05	679,0 $\pm$ 36,19	567,0 $\pm$ 34,31	619,3 $\pm$ 36,06
Leucócitos( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	9,1 $\pm$ 0,65	8,4 $\pm$ 1,00	7,7 $\pm$ 0,85	9,5 $\pm$ 0,50
Neutrófilos( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	18,1 $\pm$ 1,81	17,2 $\pm$ 1,16	17,3 $\pm$ 1,24	18,4 $\pm$ 1,38
Linfócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	65,9 $\pm$ 2,45	69,5 $\pm$ 3,47	68,4 $\pm$ 0,60	70,0 $\pm$ 3,54
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	11,3 $\pm$ 1,35	10,0 $\pm$ 1,15	10,5 $\pm$ 1,20	9,2 $\pm$ 1,18
Eosinófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,8 $\pm$ 0,08	1,0 $\pm$ 0,14	1,0 $\pm$ 0,12	0,9 $\pm$ 0,11
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	0,2 $\pm$ 0,03	0,3 $\pm$ 0,03	0,2 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,05

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Aos animais foram administrados DMSO 2 % em salina (controle) e FQ 50 mg/kg, v.o., 1 vez ao dia, durante 15 dias (tratado). Os parâmetros hematológicos foram determinados em sangue colhido com EDTA (1 - 2 mg/ml), antes (A.T.) e no final (F.T.) do tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. No final do tratamento, não houve diferença significativa para o grupo tratado, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 16 - Atividade da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre parâmetros bioquímicos em sangue de ratos**

Parâmetro	Grupo			
	Controle (A.T.)	Controle (F.T.)	Tratado (A.T.)	Tratado (F.T.)
Glicose (mg/dl)	94,0 ± 8,73	111,2 ± 3,61	90,7 ± 4,47	107,3 ± 5,02
Uréia (mg/dl)	53,7 ± 0,99	49,7 ± 2,54	54,3 ± 3,39	48,3 ± 1,73
Creatinina (mg/dl)	0,7 ± 0,03	0,7 ± 0,00	0,7 ± 0,07	0,8 ± 0,06
Albumina (mg/dl)	4,9 ± 0,11	3,6 ± 0,18	4,9 ± 0,11	3,5 ± 0,18
ALP (U/L)	79,3 ± 4,44	85,8 ± 6,16	77,8 ± 7,84	82,7 ± 9,74
ALT (U/L)	39,2 ± 5,05	36,0 ± 3,18	34,8 ± 2,15	31,0 ± 1,86
AST (U/L)	153,8 ± 12,10	156,3 ± 14,74	175,2 ± 10,56	149,3 ± 12,72
Colesterol (mg/dl)	49,2 ± 4,27	55,3 ± 3,46	47,7 ± 3,21	55,2 ± 4,51
Triglicerídes (mg/dl)	45,5 ± 5,15	41,7 ± 3,69	39,3 ± 0,88	38,3 ± 4,04
HDL (mg/dl)	48,8 ± 4,96	40,2 ± 2,73	45,3 ± 4,00	40,0 ± 3,84

Ratos Wistar, machos (180 - 230) foram utilizados. Aos animais foram administrados DMSO 2 % em salina (controle) e FQ 50 mg/kg v.o., 1 vez ao dia, durante 15 dias (tratado). Os parâmetros bioquímicos foram determinados em soro obtido antes (A.T.) e no final do tratamento (F.T.). Os valores representam a média ± EPM de 6 animas por grupo. No final do tratamento, não houve diferença significativa para o grupo tratado, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

respectivamente. Desse modo, o valor expresso em porcentagem de agregação em relação ao controle foi 99 % para o grupo tratado com FQ.

Esses resultados demonstram que FQ, administrada na dose de 50 mg/kg, v.o., 1 vez ao dia, durante 15 dias, em ratos, não produziu nenhum efeito significativo sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos avaliados. Além disso, FQ não causou nenhuma alteração significativa na agregação plaquetária induzida por ADP em PRP, obtido de amostras de sangue colhidas dos animais no 7º e 15º dia, com 1 h após o tratamento.

## **5.7 Determinação da atividade da fração quinona (FQ) de *A. oncocalyx* sobre o tempo de sangramento em camundongos**

### **5.7.1 Após a administração intraperitoneal**

A ação da FQ, administrada nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p., sobre o tempo de sangramento em camundongos, foi determinada segundo o procedimento descrito em 4.7.1.

A **Tabela 17** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sangramento medido (em segundos) antes e com 1, 3, 6 e 24 horas após o tratamento, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 10 e 30 mg/kg. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.7.1, revelou que houve diferença significativa somente para o grupo FQ 30 mg/kg, em relação ao grupo controle, com 1 e 3 h após o tratamento. ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Esses resultados demonstram que de modo significativo, FQ administrada na dose de 30 mg/kg uma única vez, causou diminuição do tempo de sangramento em camundongos, cujos valores expressos em porcentagem em relação ao controle foram 35 e 42 %, com 1 e 3 h respectivamente, após o tratamento. Com a dose menor (10 mg/kg) nenhum efeito foi detectado.



**TABELA 17 - Atividade inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada por via intraperitoneal sobre o tempo de sangramento em camundongos**

Grupo	Tempo de sangramento (s)				
	To	1 h	3 h	6 h	24 h
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	94,7 ± 7,06 (24)	82,5 ± 8,00 (25)	89,5 ± 10,22 (27)	82,8 ± 9,03 (23)	95,6 ± 8,59 (22)
FQ 10 mg/kg, i.p.	87,2 ± 6,78 (10)	104,6 ± 12,45 (10)	91,0 ± 8,30 (10)	106,1 ± 11,92 (10)	117,3 ± 14,31 (10)
FQ 30 mg/kg, i.p.	83,6 ± 8,08 (17)	53,7 ± 5,15* (16)	52,2 ± 6,29* (12)	71,7 ± 5,09 (15)	76,3 ± 6,93 (12)

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, por via intraperitoneal. O tempo de sangramento foi medido (em seg.) antes (To) e com 1, 3, 6 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,05 v s. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer

### 5.7.2 Após a administração oral

A atividade da FQ, administrada nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, v.o., sobre o tempo de sangramento em camundongos, foi determinada segundo o procedimento descrito em 4.7.2.

A **Tabela 18** mostra os valores (média  $\pm$  EPM), do tempo de sangramento medido (em seg.) antes e com 1, 3 e 24 h após o tratamento, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 50, 100 e 200 mg/kg. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.7.2, revelou que houve diferença significativa para o grupo tratado com FQ 100 mg/kg, em relação ao grupo controle, com 3 h após o tratamento. Diferença significativa também ocorreu para FQ 200 mg/kg, em relação ao controle, com 3 h após o tratamento ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

Esses resultados demonstram que FQ administrada na dose de 100 mg/kg, uma única vez, causou diminuição significativa do tempo de sangramento, cujo valor expresso em porcentagem em relação ao controle foi 41 %, com 3 h após o tratamento. A inibição por 200 mg/kg foi de 51 %, com 3 h. Com a dose menor (50 mg/kg) foi observada apenas uma tendência à diminuição, com 3 horas.

### 5.8 Determinação do número de plaquetas em sangue total após a administração intraperitoneal da fração quinona de *A. oncocalyx* em camundongos

O número de plaquetas, em sangue total de camundongos tratados com FQ nas doses de 30 e 60 mg/kg, i.p., foi determinado segundo o procedimento descrito em 4.8.

A **Tabela 19** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do número de plaquetas/mm<sup>3</sup> de sangue, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 30 e 60 mg/kg, i.p. A análise estatística dos dados, realizada conforme descrito em 4.8, revelou que não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ 30 e 60 mg/kg, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 18 - Atividade da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada por via oral sobre o tempo de sangramento em camundongos**

Grupo	Tempo de sangramento (s)			
	To	1 h	3 h	24 h
Controle (DMSO 2 % em salina 10 ml/kg, v.o.)	118,8 ± 10,13 (17)	101,3 ± 8,61 (16)	92,0 ± 10,81 (11)	94,8 ± 8,36 (17)
FQ 50 mg/kg, v.o.	120,3 ± 15,89 (9)	84,2 ± 13,32 (9)	70,3 ± 7,79 (10)	146,0 ± 16,70 (8)
FQ 100 mg/kg, v.o.	105,6 ± 19,12 (8)	99,0 ± 15,62 (8)	54,2 ± 5,59* (6)	127,8 ± 17,91 (8)
FQ 200 mg/kg, v.o.	106,2 ± 7,48 (27)	74,5 ± 6,49 (29)	45,4 ± 4,04* (17)	106,3 ± 14,79 (16)

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com DMSO 2 % em salina (controle) ou FQ uma única vez, por via oral. O tempo de sangramento foi medido (em seg.) antes (To) e com 1, 3 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,05 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 19 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre as plaquetas após administração intraperitoneal em camundongos**

Grupo	Número de plaquetas/mm <sup>3</sup> de sangue
Controle (DMSO 2 % em salina 10ml/kg, i.p.)	904.000 ± 26. 518 (9)
FQ 30 mg/kg, i.p.	966.286 ± 50.780 (7)
FQ 60 mg/Kg, i.p.	831.000 ± 111.790 (7)

Camundongos Swiss, machos, (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com DMSO 2 % em salina (controle) ou FQ por via intraperitoneal, uma única vez. O número de plaquetas foi determinado em sangue total, colhido 3 h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. Não houve diferença significativa para o grupo FQ 30 ou 60mg/kg, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  – ANOVA e teste de Tukey - Krumer).

Esses resultados demonstram que FQ administrada nas doses de 30 e 60 mg/kg, i.p., uma única vez, não causou nenhuma alteração significativa no número de plaquetas em sangue colhido de camundongos 3 h após o tratamento.

### 5.9 Determinação do efeito da fração quinona de *A. oncocalyx* sobre a musculatura lisa vascular

O efeito de FQ sobre preparações de aorta de rato foi determinado segundo o procedimento descrito em 4.9. Os valores (média  $\pm$  EPM de 4 experimentos) de relaxamento dependente do endotélio induzido pelo carbacol (1 mM) foram de 75, 57  $\pm$  8,43 % da resposta contrátil induzida pela solução despolarizante [K<sup>+</sup> 60 mM]. FQ provocou uma vasoconstrição que no seu máximo correspondeu em média  $\pm$  EPM a 208,7  $\pm$  23,15 % respectivamente, da fase tônica da contração induzida por [K<sup>+</sup> 60 mM]. O valor médio de CE50 de FQ e seus limites inferior e superior calculados foram 15, 34 [2,2 - 28,46]  $\mu$ g/ml.

As curvas concentração-efeito são representadas na **Figura 27A**, e um registro poligráfico de uma dessas curvas é mostrado na **Figura 27B**.

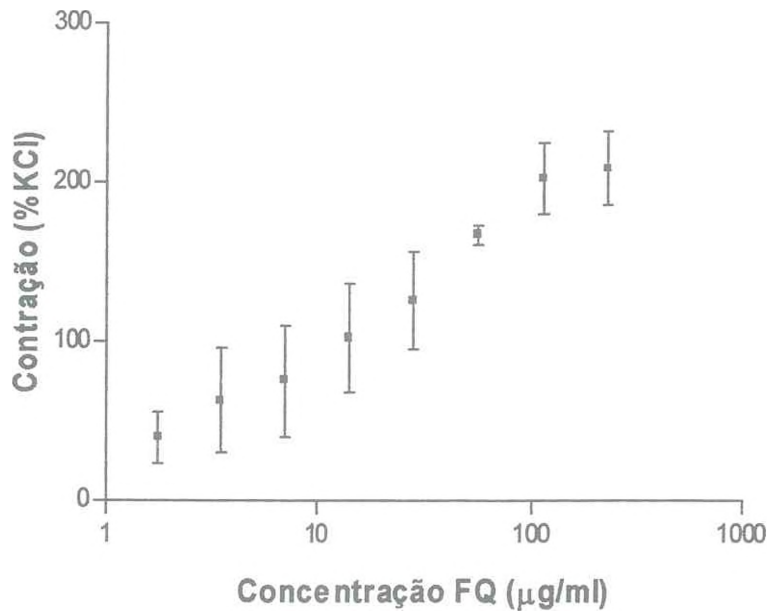
### 5.10 Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de *A. oncocalyx* *in vitro*

#### 5.10.1 Determinação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

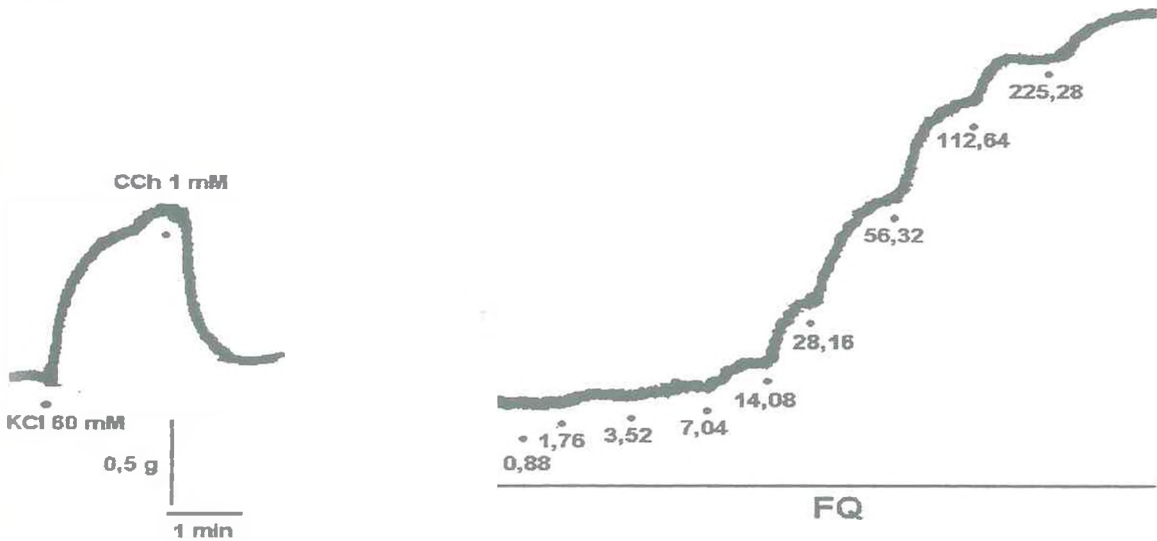
A produção de TBARS na amostra (homogeneizado de cérebro de rato), na ausência (controle) e na presença de FQ, foi determinada seguindo o procedimento descrito em 4.10.2. Para cada concentração testada, a capacidade antioxidante (CAO) de FQ foi calculada empregando a equação apresentada em 4.10.2.

A **Tabela 20** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) da CAO das concentrações de FQ testadas, calculados com base na determinação de TBARS. As diferentes concentrações de FQ e suas respectivas capacidades antioxidante foram empregadas na construção do gráfico (1/CAO vs. 1/[FQ]) apresentado a seguir (**Figura 28**).

A



B

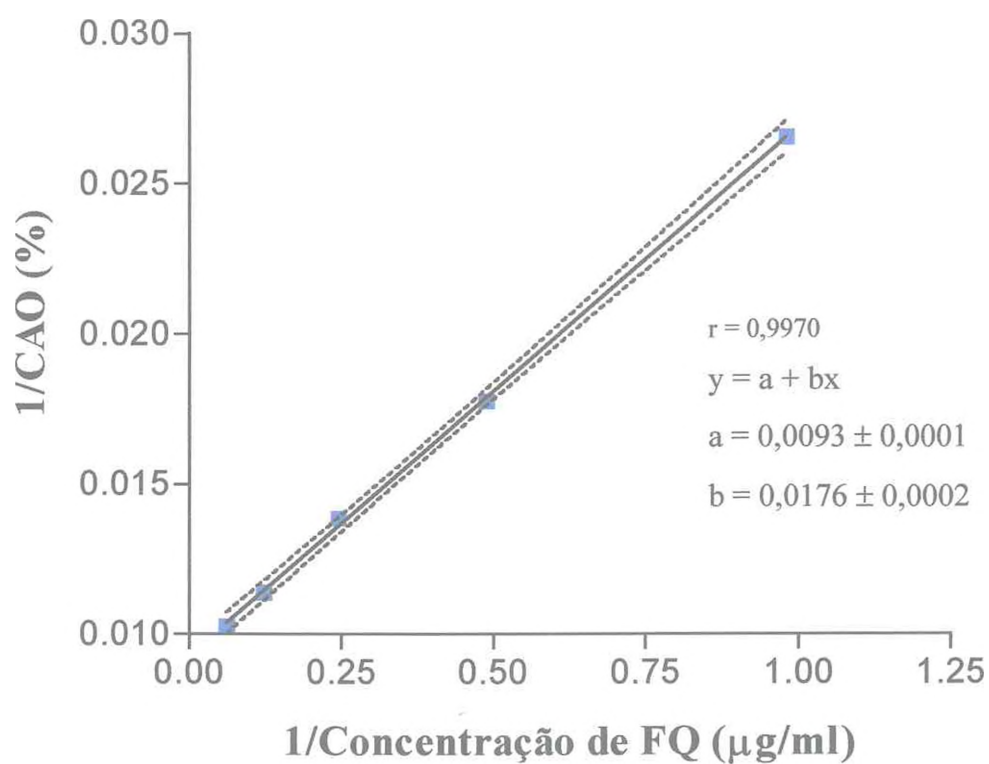


FIGURAS 27 - A (efeito da fração quinona (FQ) de *A. oncocalyx* em anéis de aorta de rato). Vasoconstrição produzida por FQ em concentrações variando linearmente de 0,22 a 225,28 µg/ml expressa como porcentagem da contração induzida pela solução despolarizante [K<sup>+</sup> 60 mM]. Os dados representam a média ± EPM (n = 4). B (curva concentração-efeito representativa). Os pontos correspondem ao momento de adição e logo abaixo estão especificadas as concentrações de FQ. Calibração vertical = 0,5 g; calibração horizontal = 1 min); CCh = carbacol.

**TABELA 20 - Capacidade antioxidante (CAO) da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* medida através da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

FQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	<sup>(CAO)</sup> TBARS (%)
16,39	97,5 $\pm$ 0,87 (7)
8,20	87,8 $\pm$ 0,70 (7)
4,10	72,93 $\pm$ 2,67 (8)
2,05	58,43 $\pm$ 3,62 (9)
1,03	39,15 $\pm$ 2,98 (7)

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Em amostras de homogeneizado de cérebro, coletado desses animais e submetido a condições (temperatura e oxigenação) controladas que determinam a ocorrência de lipoperoxidação, a CAO de FQ foi determinada com base na inibição da produção de TBARS. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de experimentos que encontra-se entre parênteses.



**FIGURA 28 - Capacidade antioxidante (CAO) de diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* medida com base na inibição da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A reta foi obtida por regressão linear através do programa "GRAPH PAD PRISM 2.0 for Windows".**



A equação da reta de regressão obtida ( $y = a + bx$ , onde  $a = 0,0093 \pm 0,0001$  e  $b = 0,0176 \pm 0,0002$ ) foi utilizada para calcular a concentração de FQ capaz de inibir a lipoperoxidação do homogeneizado de cérebro de rato em 50 % ( $Q_{1/2}$ ), cujo valor foi 1,64  $\mu\text{g/ml}$ .

### 5.10.2 Medida de quimiluminescência

A emissão de QL pela amostra (homogeneizado de cérebro de rato), na ausência (controle) e na presença de FQ, foi determinada seguindo o procedimento descrito em 4.10.3. Para cada concentração testada, a CAO de FQ, foi calculada empregando a equação apresentada em 4.10.3.

A **Tabela 21** mostra os valores (média  $\pm$  EPM), da CAO das concentrações de FQ testadas, calculados com base na medida de QL.

As diferentes concentrações de FQ e suas respectivas capacidades antioxidante foram empregadas na construção do gráfico ( $1/\text{CAO}$  vs.  $1/[\text{FQ}]$ ) apresentado a seguir (**Figura 29**). A equação da reta de regressão obtida ( $y = a + bx$ , onde  $a = 0,0062 \pm 0,0012$  e  $b = 0,0284 \pm 0,0021$ ) foi utilizada para calcular  $Q_{1/2}$  de FQ, cujo valor foi 2,06  $\mu\text{g/ml}$ .

## 5.11 Determinação da atividade antioxidante da fração quinona de *A. oncocalyx* *in vivo*

### 5.11.1 Hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono em rato

- **Avaliação da função hepática, observação histopatológica e medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido 72 h após a administração de  $\text{CCl}_4$**

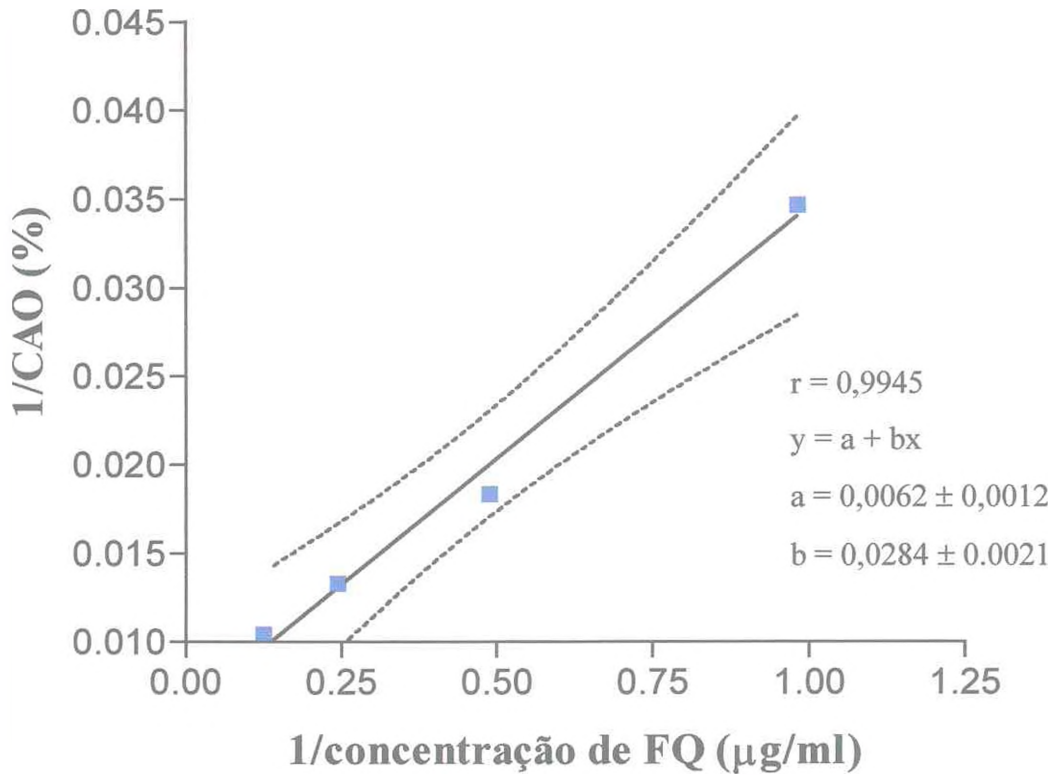
#### ⇒ **Avaliação da função hepática**

O efeito de FQ, na hepatotoxicidade causada pelo  $\text{CCl}_4$ , foi avaliado através da medida da função hepática, conforme descrito em 4.11.1. A **Tabela 22** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) dos níveis de ALT e AST em plasma heparinizado, referentes

**TABELA 21 - Capacidade antioxidante (CAO) da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* medida através da emissão de quimiluminescência (QL)**

FQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	<sup>(CAO)</sup> QL (%)
8,20	95,6 $\pm$ 0,59 (6)
4,10	75,2 $\pm$ 1,16 (6)
2,05	54,7 $\pm$ 1,54 (6)
1,02	28,9 $\pm$ 0,67 (6)

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Em amostras de homogeneizado de cérebro, coletado desses animais e submetido a condições (temperatura e oxigenação) controladas que determinam a ocorrência de lipoperoxidação, a CAO de FQ foi determinada com base na inibição da emissão de QL. Os valores representam a média  $\pm$  EPM do número de experimentos que encontra-se entre parênteses.



**FIGURA 29 - Capacidade antioxidante de diferentes concentrações da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* medida com base na inibição da emissão de quimiluminescência (QL). A reta foi obtida por regressão linear através do programa "GRAPH PAD PRISM 2.0 for Windows".**

TABELA 22 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre os níveis plasmáticos de alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) em ratos, medidos 72 h após o tratamento com o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)

Grupo	ALT (UI/L)	AST (UI/L)
Controle (salina 10 ml/kg, i.p. e óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.)	28,6 ± 2,07 (23)	86,7 ± 2,95 (23)
Salina - i.p. + CCl <sub>4</sub> 50 % em óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.)	97,0 ± 7,80* (14)	196,1 ± 16,33* (14)
FQ 10 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub>	71,2 ± 7,16 <sup>a</sup> (15)	175,07 ± 14,76 (15)
FQ 30 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub>	69,3 ± 6,98 <sup>a</sup> (14)	182,33 ± 18,16 (14)

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Os animais do grupo controle receberam os veículos de dissolução de FQ e do CCl<sub>4</sub>. Os outros grupos foram tratados com salina ou FQ por via intraperitoneal, 30 min antes e 24 e 48 h após a administração do CCl<sub>4</sub>. Os níveis de ALT e AST foram determinados em plasma heparinizado obtido 72 h após a administração do CCl<sub>4</sub>. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,001 vs. o grupo controle e <sup>a</sup>p < 0,05 vs. o grupo tratado com salina + CCl<sub>4</sub> (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

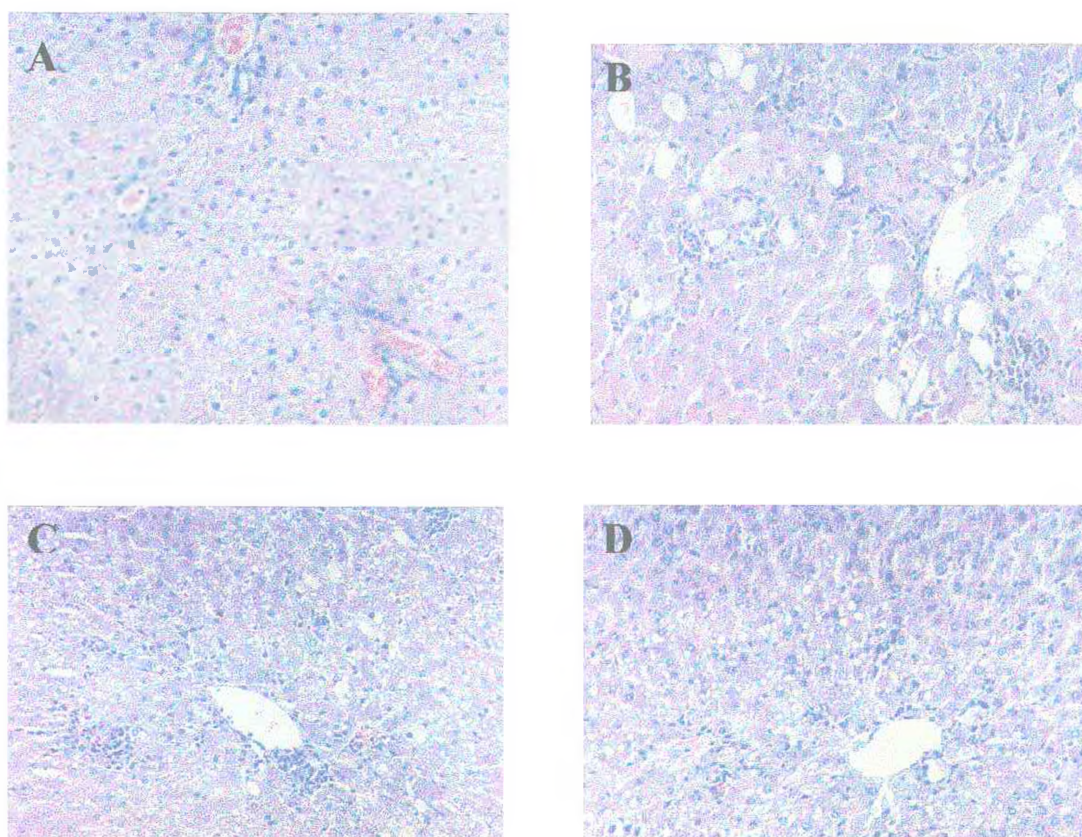
aos grupos controle, tratado somente com CCl<sub>4</sub> e tratados com FQ 10 e 30 mg/kg, i.p., 30 min antes e 24 e 48 h após a administração do CCl<sub>4</sub>.

A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o CCl<sub>4</sub>, houve aumento significativo dos níveis plasmáticos de ALT e AST (de 3,4 e 2,3 vezes) respectivamente, em relação ao grupo controle, medidos 72 h após o tratamento ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ e o CCl<sub>4</sub>, em comparação com o grupo que recebeu apenas o CCl<sub>4</sub>, ocorreu diminuição dos níveis de ALT e AST, que foi significativa somente para ALT. Ambas as doses, 10 e 30 mg/kg, produziram inibição significativa dos níveis de ALT, com valores de 27 e 29 % respectivamente. Esses valores foram muito próximos, indicando que a dose de 10 mg/kg já produz efeito máximo ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

#### ⇒ **Observação histopatológica**

A ação da FQ, sobre as alterações morfológicas produzidas pelo CCl<sub>4</sub> no tecido hepático, foi avaliada através de investigação histológica, realizada conforme descrito em 4.11.1. Em cada um dos grupos controle, tratado somente com o CCl<sub>4</sub> e tratados com FQ 10 e 30 mg/kg, i.p., 30 min. antes e 24 e 48 h após o CCl<sub>4</sub>, foram analisadas amostras de fígado de 6 animais, coletadas 72 h após a administração do CCl<sub>4</sub>. Em 100 % das amostras, do grupo tratado somente com o CCl<sub>4</sub>, foram observadas tumefação difusa e esteatose com disposição centrolobular, que variaram de moderada a intensa. Granulomas e infiltrado inflamatório moderado e difuso, composto de neutrófilos polimorfonucleares, também estavam presentes (**Figura 30B**). Essas alterações não foram observadas nas amostras do grupo controle (**Figura 30A**). Os animais que receberam FQ na dose de 10 mg/kg também apresentaram tumefação difusa e esteatose com disposição centrolobular, de moderada a intensa em 100 % das amostras. O infiltrado inflamatório mostrou-se moderado e difuso em 67 % das amostras e em 33 % foi discreto e difuso. Em 83,3 %, também foram encontrados granulomas. No grupo tratado com FQ 30 mg/kg, a esteatose centrolobular variou de moderada a intensa em 50 % das amostras, moderada a discreta em 33 % e em 17,6 %,





**FIGURAS 30 - Cortes de fígado de rato corados com hematoxilina e eosina. A** (controle - salina 10 ml/kg, i.p. + óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.; tecido normal), **B** (salina 10ml/kg, i.p. +  $\text{CCl}_4$  50 % em óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.; esteatose centrolobular intensa, granulomas e infiltrado inflamatório moderado e difuso), **C** (FQ 10 mg/kg, i.p. +  $\text{CCl}_4$ ; esteatose centrolobular moderada, granulomas e infiltrado inflamatório moderado), **D** (FQ 30 mg/kg, i.p. +  $\text{CCl}_4$ ; esteatose centrolobular moderada e infiltrado inflamatório discreto) HE, 100x.

essa alteração não ocorreu. Em todas as amostras, a tumefação variou de moderada a discreta, o infiltrado inflamatório mostrou-se discreto e difuso e não foi observada a presença de granulomas. Em nenhum dos grupos tratados com o  $\text{CCl}_4$ , inclusive aquele que recebeu apenas  $\text{CCl}_4$ , foi observada a ocorrência de necrose.

### ⇒ Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático

O efeito de FQ, sobre os níveis de lipoperoxidação induzida pelo  $\text{CCl}_4$  no tecido hepático, foi determinado conforme o procedimento descrito em 4.11.1. A **Tabela 23** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) dos níveis de TBARS, expressos em nmol de MDA/g de tecido, referentes aos grupos controle, tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  e tratados com FQ 10 e 30 mg/kg, i.p., 30 min antes e 24 e 48 h após a administração do  $\text{CCl}_4$ .

A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  houve aumento significativo dos níveis de TBARS, em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ e o  $\text{CCl}_4$  foi observada a diminuição dos níveis de TBARS, em relação ao grupo que recebeu apenas o  $\text{CCl}_4$ , mas esta não foi significativa. Os valores de inibição produzidos foram 13 e 15 % com as doses de 10 e 30 mg/kg respectivamente ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

### 5.11.2 Prolongamento por $\text{CCl}_4$ do tempo de sono induzido por pentobarbital

O efeito de FQ, sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital, foi avaliado segundo o procedimento descrito em 4.11.2.

A **Tabela 24** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 10 e 30 mg/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da injeção de pentobarbital.

A **Tabela 25** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 10, 30, 100 e 200 mg/kg, v.o., uma única vez, 60 min antes da injeção de pentobarbital. Em ambos os casos ou seja, tanto por administração intraperitoneal como oral, a análise estatística dos dados revelou que não

**TABELA 23 - Efeito da administração da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre os níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos tratados com tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>)**

Grupo	(TBARS) (nmol de MDA/g de tecido)
Controle (salina 10 ml/kg, i.p. + óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.)	22,4 ± 2,20 (8)
Salina + CCl <sub>4</sub> 50 % em óleo de oliva 3 ml/kg, s.c.	39,4 ± 1,34* (8)
FQ 10 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub>	34,3 ± 2,42 (8)
FQ 30 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub>	33,6 ± 1,27 (8)

Ratos Wistar, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ 30 min antes e 24 e 48 h após a administração do CCl<sub>4</sub>. TBARS foi determinado em homogeneizado de fígado coletado 72 h após o tratamento com o CCl<sub>4</sub>. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,001 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ + CCl<sub>4</sub>, em relação ao grupo que recebeu salina + CCl<sub>4</sub>.



**TABELA 24 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada por via intraperitoneal sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos**

Grupo	Tempo de sono (s)
Controle (salina, i.p. + pentobarbital 40 mg/kg, i.p.)	2416,0 ± 111,45 (12)
FQ 10 mg/kg, i.p. + pentobarbital	2339,7 ± 172,69 (12)
FQ 30 mg/kg, i.p. + pentobarbital	2446,8 ± 182,36 (11)

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min antes da administração do pentobarbital. Em seguida o tempo de sono (segundos) foi registrado. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. Não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  ANOVA).

**TABELA 25 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada por via oral sobre o tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos**

Grupo	Tempo de sono (s)
Controle (DMSO 2 % em salina 10 ml/kg, v.o. + pentobarbital 40 mg/kg, i.p.)	1747,6 ± 133,71 (18)
FQ 10 mg/kg, v.o. + pentobarbital	1678,2 ± 145,28 (10)
FQ 30 mg/kg, v.o. + pentobarbital	1627,6 ± 144,13 (10)
FQ 100 mg/kg, v.o. + pentobarbital	1578,8 ± 106,00 (9)
FQ 200 mg/kg, v.o. + pentobarbital	1756,9 ± 110,87 (9)

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 60 min antes da administração do pentobarbital. Em seguida o tempo de sono (segundos) foi registrado. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. Não houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  ANOVA).

houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Esses resultados demonstram que FQ, administrada nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p. e nas doses de 10, 30, 100 e 200 mg/kg, v.o., não causou nenhuma alteração significativa no tempo de sono induzido por pentobarbital 40 mg/kg, i.p.

O efeito de FQ sobre o prolongamento por  $\text{CCl}_4$  do tempo sono induzido pelo pentobarbital foi avaliado segundo o procedimento descrito em 4.11.2.

A **Tabela 26** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono induzido por pentobarbital, referentes aos grupos controle, tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  e tratados com FQ 1, 10 e 30 mg/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da administração do  $\text{CCl}_4$ . A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  houve aumento significativo do tempo de sono induzido por pentobarbital (de 4,5 vezes), em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ antes do  $\text{CCl}_4$  ocorreu diminuição do tempo de sono induzido por pentobarbital, com valores de 17, 45 e 44 % para as doses de 1, 10 e 30 mg/kg respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas o  $\text{CCl}_4$ . Somente as doses de 10 e 30 mg/kg produziram inibição significativa. Esta foi similar, indicando que a dose de 10 mg/kg já produz o efeito máximo ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

A **Tabela 27** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono induzido por pentobarbital, referentes aos grupos controle, tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  e tratados com FQ 10, 30, 100 e 200 mg/kg, v.o., uma única vez, 60 min. antes da administração do  $\text{CCl}_4$ . A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  houve aumento significativo do tempo de sono induzido por pentobarbital (de 4,8 vezes), em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ antes do  $\text{CCl}_4$  ocorreu diminuição significativa do tempo de sono induzido por pentobarbital, com valores de 19 e 29 % para as doses de 100 e 200 mg/kg respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas o  $\text{CCl}_4$  ( $p < 0,05$ ). As doses de 10 e 30 mg/kg não produziram nenhum efeito ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

houve diferença significativa para os grupos tratados com FQ, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Esses resultados demonstram que FQ, administrada nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p. e nas doses de 10, 30, 100 e 200 mg/kg, v.o., não causou nenhuma alteração significativa no tempo de sono induzido por pentobarbital 40 mg/kg, i.p.

O efeito de FQ sobre o prolongamento por  $\text{CCl}_4$  do tempo sono induzido pelo pentobarbital foi avaliado segundo o procedimento descrito em 4.11.2.

A **Tabela 26** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono induzido por pentobarbital, referentes aos grupos controle, tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  e tratados com FQ 1, 10 e 30 mg/kg, i.p., uma única vez, 30 min antes da administração do  $\text{CCl}_4$ . A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  houve aumento significativo do tempo de sono induzido por pentobarbital (de 4,5 vezes), em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ antes do  $\text{CCl}_4$  ocorreu diminuição do tempo de sono induzido por pentobarbital, com valores de 17, 45 e 44 % para as doses de 1, 10 e 30 mg/kg respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas o  $\text{CCl}_4$ . Somente as doses de 10 e 30 mg/kg produziram inibição significativa. Esta foi similar, indicando que a dose de 10 mg/kg já produz o efeito máximo ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

A **Tabela 27** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo de sono induzido por pentobarbital, referentes aos grupos controle, tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  e tratados com FQ 10, 30, 100 e 200 mg/kg, v.o., uma única vez, 60 min. antes da administração do  $\text{CCl}_4$ . A análise estatística dos dados revelou que no grupo tratado somente com o  $\text{CCl}_4$  houve aumento significativo do tempo de sono induzido por pentobarbital (de 4,8 vezes), em relação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Porém, nos grupos tratados com FQ antes do  $\text{CCl}_4$  ocorreu diminuição significativa do tempo de sono induzido por pentobarbital, com valores de 19 e 29 % para as doses de 100 e 200 mg/kg respectivamente, em relação ao grupo que recebeu apenas o  $\text{CCl}_4$  ( $p < 0,05$ ). As doses de 10 e 30 mg/kg não produziram nenhum efeito ( $p > 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 26 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncostylyx* administrada por via intraperitoneal sobre o prolongamento por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos**

Grupo	Tempo de sono (s)
Controle (salina 10 ml/kg, i.p. + pentobarbital 40 mg/kg, i.p.)	1772,2 ± 121,82 (10)
Salina, i.p + CCl <sub>4</sub> 20 % em óleo de oliva 3 ml/kg, s.c. + pentobarbital	7954,0 ± 669,74* (9)
FQ 1 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	6571,4 ± 617,89 (9)
FQ 10 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	4383,6 ± 478,88 <sup>a</sup> (10)
FQ 30 mg/kg, i.p. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	4453,1 ± 384,44 <sup>a</sup> (9)

Camundongos Swiss, machos (25 - 30 g) foram utilizados. Os animais do grupo controle receberam salina e pentobarbital. Os outros grupos foram tratados com salina ou FQ uma única vez, 30 min antes da injeção do CCl<sub>4</sub>. O pentobarbital foi administrado 24 h após o tratamento com o CCl<sub>4</sub> e em seguida o tempo de sono (segundos) foi registrado. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,001 vs. o grupo controle e <sup>a</sup>p < 0,05 vs. o grupo tratado com salina + CCl<sub>4</sub> + pentobarbital (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 27 - Efeito da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada por via oral sobre o prolongamento por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>) do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos**

<b>Grupo</b>	<b>Tempo de sono (s)</b>
Controle (DMSO 2 % em salina 10 ml/kg, v.o. + pentobarbital 40mg/kg, i.p.)	1647,6 ± 142,56 (13)
DMSO 2 % em salina 10 mg/kg, v.o. + CCl <sub>4</sub> 20 % em óleo de oliva 3 ml/kg, - s.c. + pentobarbital	7967,4 ± 412,81* (14)
FQ 10mg/Kg - v.o. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	8246,1 ± 452,53 (10)
FQ 30mg/Kg - v.o. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	8139,0 ± 388,47 (9)
FQ 100mg/Kg - v.o. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	6463,0 ± 259,63 <sup>a</sup> (10)
FQ 200mg/Kg - v.o. + CCl <sub>4</sub> + pentobarbital	5679,3 ± 450,29 <sup>a</sup> (9)

Camundongos Swiss, machos (180 - 230 g) foram utilizados. Os animais do grupo controle receberam DMSO 2 % em salina e pentobarbital. Os outros grupos foram tratados com salina ou FQ uma única vez, 60 min antes da injeção do CCl<sub>4</sub>. O pentobarbital foi administrado 24 h após o tratamento com o CCl<sub>4</sub> e em seguida o tempo de sono (segundos) foi registrado. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,001 vs. o grupo controle e <sup>a</sup>p < 0,05 vs. o grupo tratado com DMSO 2 % em salina + CCl<sub>4</sub> + pentobarbital (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

## 5.12 Determinação da atividade antiedematogênica da fração quinona de *A. oncocalyx*

### 5.12.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina em rato

A ação da FQ, sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos, foi determinada conforme descrito em 4.12.1.

A **Tabela 28** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do volume do edema de pata (ml) medido com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com FQ nas doses de 1, 10 e 30 mg/kg, i.p. A análise estatística dos dados revelou que FQ nas doses de 10 e 30 mg/kg causou diminuição significativa do edema de pata, com 2, 3 e 4 h após a administração de carragenina, em relação ao grupo controle. Os dados da Tabela 28 foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 31**). Para a dose de 10 mg/kg, os valores de inibição expressos em porcentagem em relação ao controle foram 46, 57 e 48 %, com 2, 3 e 4 h respectivamente. Para a dose de 30 mg/kg, os valores de inibição foram 50, 60, 51 %, com 2, 3 e 4 h respectivamente. A dose menor (1 mg/kg) não produziu efeito significativo.

A **Tabela 29** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do volume do edema de pata (ml) medido com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 100 e 200 mg/kg, v.o. A análise estatística dos dados revelou que FQ na dose de 200 mg/kg causou diminuição significativa do edema de pata com 3 e 4 h após a administração de carragenina, em relação ao grupo controle. Os dados da **Tabela 29** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 32**). Os valores de inibição foram 25 e 24 % com 3 e 4 h respectivamente. A menor dose (100 mg/kg) não produziu efeito significativo.

### 5.12.2 Modelo de edema de pata induzido por dextrano em rato

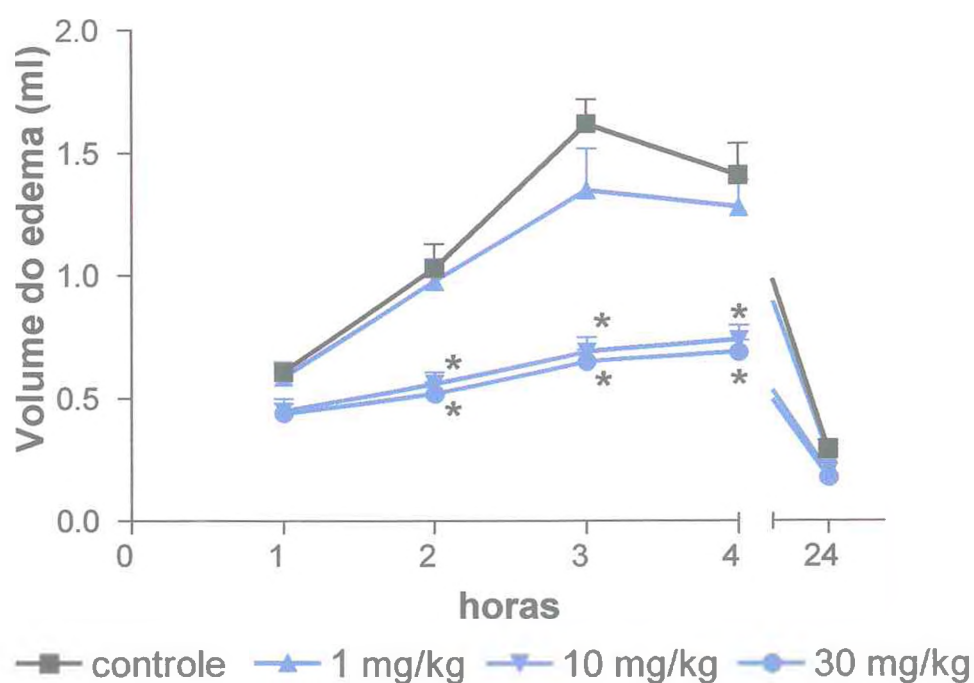
A ação da FQ sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos foi determinada conforme descrito em 4.12.2. A **Tabela 30** mostra os valores (média  $\pm$

**TABELA 28 - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada pela via intraperitoneal sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos**

Grupo	Volume do edema (ml)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	0,61 ± 0,03	1,03 ± 0,10	1,62 ± 0,10	1,41 ± 0,13	0,29 ± 0,04
FQ 1 mg/kg, i.p.	0,59 ± 0,06	0,98 ± 0,09	1,35 ± 0,17	1,28 ± 0,11	0,27 ± 0,03
FQ 10 mg/kg, i.p.	0,45 ± 0,05	0,56 ± 0,05*	0,69 ± 0,06*	0,74 ± 0,06*	0,20 ± 0,02
FQ 30 mg/kg, i.p.	0,44 ± 0,04	0,52 ± 0,05*	0,65 ± 0,05*	0,69 ± 0,05*	0,18 ± 0,02

Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min. antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a administração de carragenina. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. \*p < 0,05 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



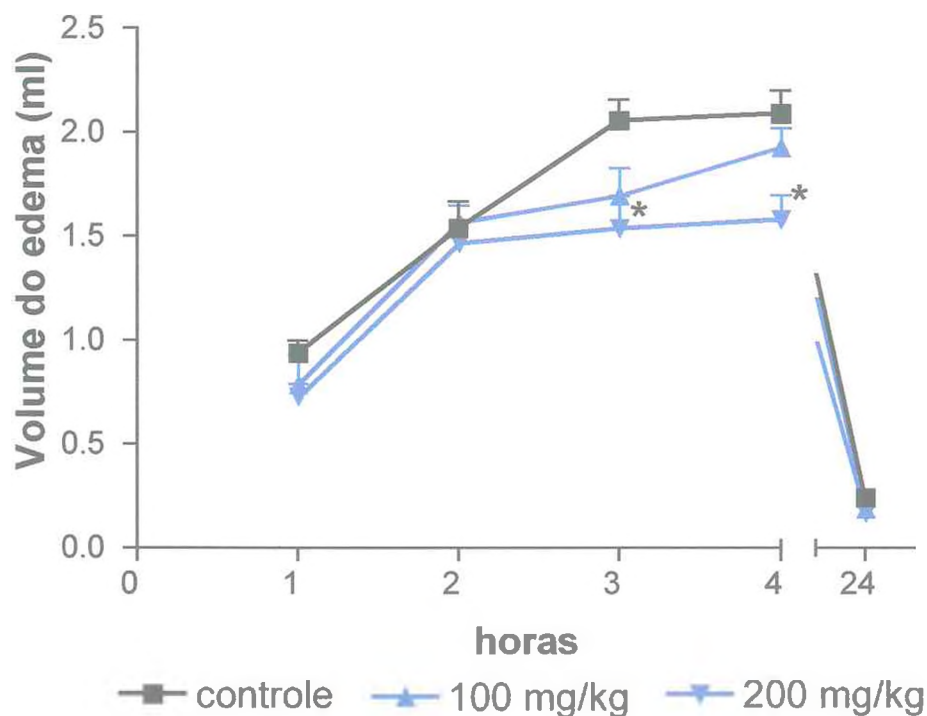


**FIGURA 31** - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada pela via intraperitoneal sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 29 - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada pela via oral sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos**

Grupo	Volume do edema (ml)				
	1 h	2 h	3 h	4 h	24 h
Controle (DMSO 2 % em salina 10 ml/kg, v.o.)	0,94 ± 0,06	1,54 ± 0,13	2,06 ± 0,10	2,09 ± 0,11	0,24 ± 0,04
FQ 100 mg/kg, v.o.	0,79 ± 0,14	1,57 ± 0,08	1,70 ± 0,13	1,93 ± 0,09	0,19 ± 0,02
FQ 200 mg/kg, v.o.	0,73 ± 0,06	1,47 ± 0,18	1,54 ± 0,16*	1,58 ± 0,12*	0,17 ± 0,02

Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 60 min. antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a administração de carragenina. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. \*p < 0,05 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



**FIGURA 32** - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* administrada pela via oral sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 60 min. antes da injeção intraplantar de 0,1 ml da solução de carragenina 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com 1, 2, 3, 4 e 24 h após a administração de carragenina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 30 - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos**

Grupo	Volume do edema (ml)				
	½ h	1 h	2 h	3 h	4 h
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	2,36 ± 0,13	3,03 ± 0,13	3,14 ± 0,11	3,1 ± 0,08	2,4 ± 0,15
FQ 1 mg/kg, i.p	2,78 ± 0,21	3,11 ± 0,18	2,99 ± 0,12	2,7 ± 0,14	2,7 ± 0,12
FQ 10 mg/kg, i.p.	2,19 ± 0,11	2,38 ± 0,08	1,99 ± 0,24*	1,8 ± 0,24*	1,6 ± 0,25
FQ 30 mg/kg, i.p.	2,04 ± 0,30	2,22 ± 0,27*	1,74 ± 0,23*	1,6 ± 0,28*	1,4 ± 0,24*

Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min. antes da injeção intraplantar de 0,1ml da solução de dextrano 1,5 %, na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com ½, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de dextrano. Os valores representam a média ± EPM de 6 animais por grupo. \*p > 0,05 v.s. o grupo controle ( ANOVA e teste de Tukey – Kramer).

EPM) do volume do edema de pata (ml) medido com ½, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de dextrano, referentes aos grupos controle e tratados com FQ nas doses de 1, 10, e 30 mg/kg, i.p.

A análise estatística dos dados revelou que FQ, nas doses de 10 e 30 mg/kg, causou redução significativa do edema de pata em relação ao grupo controle. Os dados da Tabela 30 foram utilizados para a construção do gráfico apresentado a seguir (**Figura 33**). Para a dose de 10 mg/kg, os valores de inibição expressos em porcentagem em relação ao controle foram 37 e 42 %, com 2 e 3 h respectivamente, após a injeção de dextrano. Para a dose de 30 mg/kg, os valores de inibição foram 27, 45, 48 e 41%, com 1, 2, 3 e 4 h respectivamente. A dose menor (1mg/kg) não produziu efeito significativo.

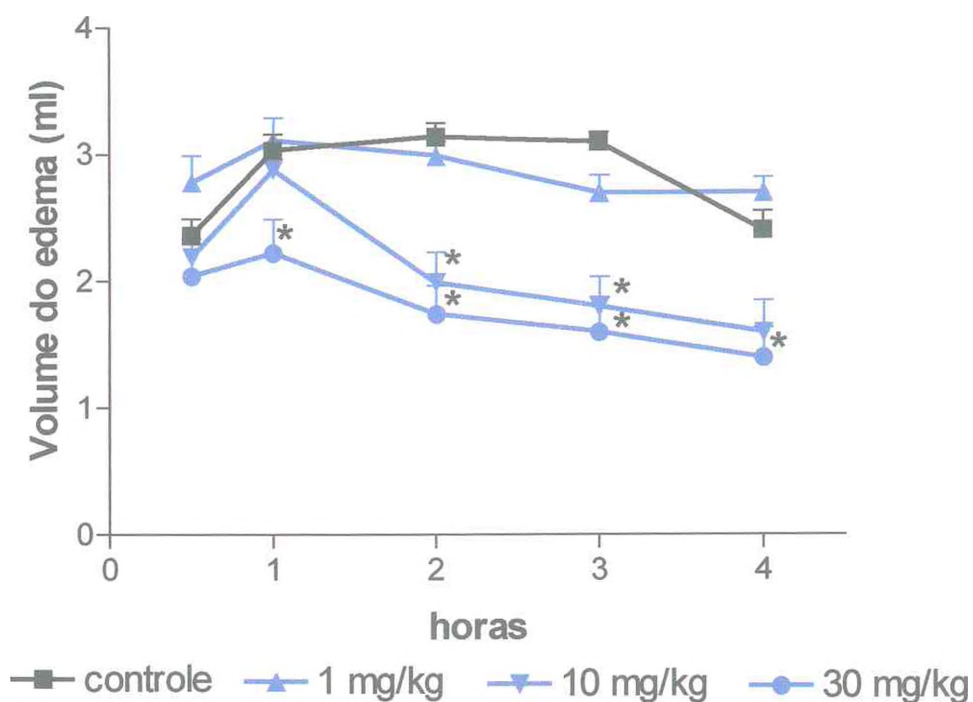
### **5.13 Determinação da atividade antinociceptiva da fração quinona de *A. oncocalyx***

#### **5.13.1 Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos**

A ação antinociceptiva da FQ, no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, foi determinada conforme descrito em 4.13.1.

A **Tabela 31** mostra os valores (média ± EPM) do número de contorções manifestadas pelos animais, referentes aos grupos controle e tratados com FQ nas doses de 0,1, 1 e 5 mg/kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de FQ testadas, são também apresentados.

A análise estatística dos dados revelou que FQ, nas doses de 1 e 5 mg/kg, i.p., causou inibição significativa do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Os valores de inibição em relação ao controle foram 26 e 60 % para as doses de 1 e 5 mg/kg respectivamente.



**FIGURA 33** - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre o edema de pata induzido por dextrano em ratos. Ratos Wistar, machos (150 - 200 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min antes da injeção intraplantar de 0,1ml da solução de dextrano 1,5 %, na pata traseira, direita do animal. O volume do edema foi medido com ½, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de dextrano. Os valores representam a média  $\pm$  EPM de 6 animais por grupo. \* $p > 0,05$  v.s. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

**TABELA 31 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos**

Grupo	Número de contorções	Inibição (%)
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	24,5 ± 1,80 (16)	—
FQ 0,1 mg/kg, i.p.	23,6 ± 1,09 (10)	—
FQ 1 mg/kg, i.p.	18,2 ± 1,42* (10)	26
FQ 5 mg/kg, i.p.	9,7 ± 0,92* (10)	60

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle) ou FQ uma única vez, 30 min antes da administração da solução de ácido acético 0,6 %, no volume de 10 ml/kg, i.p. A partir de 10 min após a injeção do ác. acético, o número de contorções foi registrado durante 20 min. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,05 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Os valores de inibição do número de contorções, expressos em porcentagem em relação ao controle, são também apresentados.

### 5.13.2 Teste da formalina

O efeito inibitório de FQ, sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos, foi determinado segundo o protocolo descrito em 4.13.2.

A **Tabela 32** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, nas fases inicial e tardia após a injeção de formalina, referentes aos grupos controle e tratados com FQ nas doses de 1, 5 e 10 mg/kg, i.p. e meperidina 20 mg/kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de FQ e a meperidina são também apresentados.

A análise estatística dos dados revelou que FQ, somente nas doses de 5 e 10 mg/kg, i.p., causou inibição significativa do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, apenas na fase tardia do teste, em relação ao grupo controle. Os valores de inibição foram 27 e 52 %, para FQ 5 e 10 mg/kg respectivamente. De modo significativo em relação ao controle, a inibição produzida por meperidina ocorreu em ambas as fases. Os valores de inibição foram 37 e 92 %, nas fases inicial e tardia respectivamente ( $p < 0,05$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer).

O envolvimento do sistema opióide, no efeito de FQ sobre a nocicepção induzida por formalina, foi investigado conforme descrito em 4.12.2. A **Tabela 33** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, nas fases inicial e tardia, após a injeção de formalina, referentes aos grupos controle e tratados com FQ 30 mg/kg, i.p.; morfina 5 mg/kg, i.p.; naloxona 2 mg/kg, s.c. + FQ e naloxona + morfina. Os valores de inibição, expressos em porcentagem em relação ao controle, relativos a FQ e a morfina são também apresentados.

A análise estatística dos dados revelou que FQ causou inibição significativa (62 %) do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, apenas na fase tardia do teste, em relação ao grupo controle. De modo significativo em relação ao controle, a inibição produzida pela morfina ocorreu em ambas as fases. Os valores de inibição foram 55 e 85 %, nas fases inicial e tardia respectivamente ( $p < 0,001$  - ANOVA e teste de Tukey - Kramer). A naloxona não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo de FQ 30



**TABELA 32 - Ação inibitória da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos**

Grupo	Tempo (s)		Inibição (%)	
	F. inicial	F. tardia	F. inicial	F. tardia
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	56,6 ± 2,57 (21)	26,4 ± 1,86 (21)	—	—
FQ 1 mg/kg, i.p.	55,1 ± 3,06 (11)	25,3 ± 1,26 (11)	—	—
FQ 5 mg/kg, i.p.	53,5 ± 3,14 (12)	19,3 ± 1,68* (12)	—	27
FQ 10 mg/kg, i.p.	58,5 ± 2,73 (10)	12,8 ± 1,22* (10)	—	52
Meperidina 20 mg/kg, i.p.	35,8 ± 3,19* (12)	2,0 ± 0,31* (12)	37	92

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle), FQ ou meperidina uma única vez, 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de formalina 1 %, na pata traseira, direita do animal. O tempo (em segundos), gasto pelo animal lambendo a pata, foi registrado durante os primeiros 5 min (F. inicial) e com 20 até 25 min (F. tardia) após a injeção de formalina. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,05 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Os valores de inibição do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, expressos em porcentagem em relação ao controle, são também apresentados.

**TABELA 33 - Avaliação do envolvimento do sistema opióide na ação da fração quinona de *Auxemma oncocalyx* sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos**

Grupo	Tempo (s)		Inibição (%)	
	F. inicial	F. tardia	F. inicial	F. tardia
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	50,9 ± 2,63 (12)	28,2 ± 2,77 (12)	—	—
FQ 30 mg/kg, i.p.	48,4 ± 3,24 (11)	10,7 ± 1,35* (11)	—	62
Morfina 5 mg/kg, i.p.	22,9 ± 1,75* (12)	4,2 ± 0,89* (12)	55	85
Naloxona 2 mg/kg, s.c. + FQ 30 mg/kg, i.p.	47,4 ± 3,34 (10)	9,1 ± 1,57* (10)	—	68
Naloxona 2 mg/kg, s.c. + morfina 5 mg/kg, i.p.	50,6 ± 4,41 (12)	25,6 ± 2,69 (12)	—	—

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle), FQ ou morfina uma única vez, 30 min antes da injeção intraplantar de 20 µl da solução de formalina 1 %, na pata traseira, direita do animal. A naloxona foi administrada 15 min antes do tratamento com FQ ou morfina + injeção de formalina. O tempo (em segundos), gasto pelo animal lambendo a pata, foi registrado durante os primeiros 5 min (F. inicial) e com 20 até 25 min (F. tardia) após a injeção de formalina. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,001 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer). Os valores de inibição do tempo gasto pelo animal lambendo a pata, expressos em porcentagem em relação ao controle, são também apresentados.

mg/kg, i.p., na fase tardia. Porém, a naloxona reverteu o efeito antinociceptivo da morfina 5 mg/kg, i.p., em ambas as fases.

### 5.13.3 Teste da placa quente

A ação da FQ, no teste da placa quente, foi determinada segundo o protocolo descrito em 4.13.3.

A **Tabela 34** mostra os valores (média  $\pm$  EPM) do tempo decorrido até o animal responder ao estímulo térmico, medido antes ( $T_0$ ) e com 30, 60 e 90 min. após o tratamento, referentes aos grupos controle e tratados com FQ nas doses de 5 e 10 mg/kg, i.p.

A análise estatística dos dados revelou que FQ, nas doses testadas, não causou nenhuma alteração significativa no tempo decorrido até o animal responder ao estímulo térmico, em relação ao grupo controle ( $p > 0,05$  - ANOVA).

**TABELA 34 - Ação da fração quinona (FQ) de *Auxemma oncocalyx* e morfina no teste da placa quente em camundongos**

Grupo	Tempo decorrido até a reação (s)			
	T <sub>0</sub>	30 min.	60 min.	90 min.
Controle (salina 10 ml/kg, i.p.)	15,8 ± 1,13 (16)	15,2 ± 0,96 (16)	13,5 ± 0,87 (16)	12,6 ± 1,10 (16)
FQ 5 mg/kg, i.p.	13,6 ± 1,38 (10)	14,2 ± 1,06 (10)	10,9 ± 0,57 (10)	13,3 ± 1,28 (10)
FQ 10 mg/kg, i.p.	12,5 ± 1,34 (10)	13,7 ± 1,74 (10)	11,2 ± 1,37 (10)	11,8 ± 1,16 (10)
FQ 30 mg/kg, i.p.	16,0 ± 1,51 (10)	16,2 ± 1,04 (10)	15,8 ± 0,87 (10)	12,6 ± 1,29 (10)
Morfina 5 mg/kg, i.p.	15,3 ± 1,54 (10)	28,0 ± 3,04* (10)	23,7 ± 2,09* (10)	19,3 ± 1,68* (10)

Camundongos Swiss, machos (20 - 30 g) foram utilizados. Os animais foram tratados com salina (controle), FQ ou morfina uma única vez. O tempo (em segundos) que o animal levou para reagir (lamber as patas traseiras e/ou saltar sobre uma placa aquecida a  $55,0 \pm 0,5$  °C) foi medido antes (T<sub>0</sub>) e com 30, 60 e 90 min após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais que encontra-se entre parênteses. \*p < 0,01 vs. o grupo controle (ANOVA e teste de Tukey - Kramer).



## 6. DISCUSSÃO

Estudar as ações farmacológicas de onocalixona A seria o ideal, mas para isso, não havia quantidade suficiente desse composto isolado. Esse fato estimulou a tentativa de obter um método eficiente e rápido de extração da onocalixona A, a partir do extrato metanólico do cerne de *A. onocalyx*, o qual existia em maior disponibilidade. A onocalixona A contém dois grupamentos hidroxila (OH) em sua molécula, que lhe conferem certa hidrossolubilidade (Figura 2). Por isso, o extrato metanólico foi submetido à lavagem exaustiva com água destilada, seguida de filtração e posterior liofilização do filtrado. Visto que a onocalixona A representa cerca de 80 % da fração hidrossolúvel resultante (FQ), o método empregado mostrou-se eficiente.

Considerando as vias de administração testadas (intraperitoneal e oral), a DL50 da fração quinona determinada em camundongos foi menor por via intraperitoneal indicando que a sua absorção oral é mais lenta. Desse modo, FQ manifestou maior toxicidade aguda após a administração intraperitoneal.

A pesquisa de novos fármacos antitrombóticos tem resultado no isolamento de muitos constituintes de plantas com atividade antiagregante plaquetária. Esses compostos de vários grupos químicos, inclusive quinonas, inibem a função plaquetária através de diferentes mecanismos.

Frangulina B, uma antraquinona isolada de *Rhammus formosana*, quando testada frente a diversos agonistas (ADP, trombina, PAF, ácido araquidônico e colágeno) inibiu especificamente a agregação plaquetária induzida por colágeno e é apontada como um provável antagonista do receptor de colágeno (Teng e cols., 1993).

Foi demonstrado que *in vitro*, a cinamofilina ((8R,8'S)-4,4'-dihidroxi-3,3'-dimetoxi-7-oxo-8,8'-neoligan) obtida de *Cinnamomum philippinense* inibe a função plaquetária, atuando de duas maneiras, como inibidor da síntese de TXA<sub>2</sub> e antagonista de receptor do TXA<sub>2</sub>. *In vivo*, esse composto causou acentuado aumento do tempo de sangramento, por incisão na cauda, em camundongos (Yu e cols., 1994).

“Shikonin” e derivados (naftoquinonas) provenientes de *Arnebia euchroma* (Ko e cols., 1995), protopina (alcalóide) de *Corydalis tashiroi* e *Corydalis pallida* (Ko

e cols., 1989) e derivados cumarínicos das espécies *Citrus grandis*, *Severinia huxifolia* e *Poncirus trifoliata* (Teng e cols., 1992) inibem a hidrólise de fosfolipídeo inositol no processo de ativação plaquetária.

Os compostos fenólicos, gingerol isolado de *Zingiber officinale* (Guh e cols., 1995) e capsaicina obtida de *Capsicum spp.* (Wang e cols., 1985), atuam do mesmo modo que a aspirina ou seja, impedem a formação de TXA<sub>2</sub>, inibindo a ciclooxigenase. O alcalóide girinimbina (alcalóide) proveniente de *Murraya euchrestifolia* além de inibir a ciclooxigenase, induz o aumento dos níveis citoplasmáticos de cAMP em plaquetas (Ko e cols., 1994).

Visto que alguns compostos atuam como antagonistas de receptor, inibindo especificamente a ativação plaquetária induzida por um dado agonista, como por exemplo: a frangulina B (Teng e cols., 1993) e clopidogrel, antagonista de receptor do ADP, (Gachet, 1995), a possível especificidade de ação antiagregante plaquetária da fração quinona de *A. oncocalyx* foi investigada. Em PRP obtido de amostras de sangue humano, o efeito de FQ sobre a resposta de plaquetas a vários agentes agregantes foi determinado *in vitro*. Os mais importantes agonistas fisiológicos de plaquetas: ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina foram utilizados; cabe aqui portanto, considerar seus respectivos receptores.

O ADP é liberado dos grânulos densos de plaquetas ativadas pelo próprio ADP e por outros agonistas (Puri e Colman, 1997). *In vitro*, em PRP, o ADP pode induzir os dois tipos de agregação, primária (reversível), em baixas concentrações (de 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$ ) e secundária (irreversível), em concentrações elevadas, que variam de 2 a 5  $\mu\text{M}$  (Yardumian, 1986).

A ativação plaquetária por ADP resulta em alteração de forma, agregação, produção de TXA<sub>2</sub> e secreção dos grânulos. Além disso, induz a inibição de adenilil ciclase, previamente estimulada por PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>1</sub>, mobilização de cálcio de seus estoques no citoplasma e o rápido influxo de cálcio (Jin e cols., 1998). Embora contribuições de caráter multidisciplinar tenham aumentado consideravelmente os conhecimentos sobre as respostas de plaquetas ao ADP, os mecanismos de transdução de sinal envolvidos ainda não foram elucidados, porque a identidade do receptor desse

agonista permanece indefinida (Puri e Colman, 1997; Jin e cols., 1998). Várias moléculas presentes na membrana plasmática de plaquetas, inclusive agregina, uma proteína de 100 KDa e a glicoproteína IIa, um componente do receptor de fibrinogênio, foram propostas como sendo o receptor de ADP, mas não houve confirmação posterior (Jin e cols., 1998).

Diversos receptores de ATP, ADP e UDP foram clonados recentemente. Esses receptores purinérgicos pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G e foram designados  $P_2$ , terminologia que os distingue dos receptores de adenosina, denominados  $P_1$ . Com base em estudos farmacológicos, foram descritos os subtipos  $P_{2X}$ ,  $P_{2Y}$ ,  $P_{2T}$  e outros. (Boarder e cols., 1995). Até o momento, foram clonados de plaquetas humanas os receptores:  $P_{2X1}$ , suposto mediador de influxo rápido de cálcio e  $P_{2Y1}$ , que via fosfolipase C, parece responder por alteração de forma, aumento da concentração citoplasmática de  $Ca^{2+}$  e agregação, mas não pela inibição da adenilil ciclase (Jin e cols., 1998). Estudos farmacológicos indicam a ocorrência de mais um receptor ( $P_{2TAC}$ ), mediador da inibição de adenilil ciclase, ainda não caracterizado e sugerem que os receptores  $P_{2Y1}$  e  $P_{2TAC}$  atuam concomitantemente, regulando diferentes aspectos do acoplamento, estímulo por ADP e resposta das plaquetas (Daniel e cols., 1999; Jantzen e cols., 1999).

A trombina, protease gerada nos sítios de dano vascular, além de outras ações, atua como potente ativador de plaquetas *in vitro*, sendo capaz de induzir secreção e agregação, mesmo quando a via ciclooxigenase está bloqueada (Siess e cols., 1983). Além de promover a hidrólise de fosfatidilinositol, outro mecanismo de ativação plaquetária pela trombina é a inibição de adenilil ciclase, previamente estimulada por  $PGI_2$  e  $PGE_1$  (Brass e cols., 1986; Banga e cols., 1988).

Vu e cols., (1991) relataram a clonagem de um receptor de trombina humano, membro da superfamília de receptores acoplados a proteínas G. A extensão terminal, amino, de localização extracelular do receptor, contém estruturas cruciais para a sua função. Nesse domínio, a trombina provavelmente exerce sua atividade enzimática, promovendo a clivagem do receptor, com conseqüente exposição de um novo terminal amino, o que causaria a ativação do receptor. O modelo acima delineado é o de um



receptor peptídico que contém seu próprio ligante, que é revelado através de clivagem pela trombina (Coughlin, 1994). Foi demonstrado que ambos os eventos de sinalização estimulados pela trombina, a hidrólise de fosfatidilinositol e inibição da adenilil ciclase, podem ser mediados por esse receptor, mas os dados disponíveis não excluem totalmente a existência de um segundo receptor de trombina na plaqueta (Hung e cols., 1992). Quanto a glicoproteína Ib (GPIb), um outro sítio de ligação da trombina na plaqueta (Barrie, 1990), seu papel no processo de ativação ainda não foi elucidado. Segundo Hung e cols., (1992), a sinalização pela trombina ocorre claramente em células que não expressam GPIb e evidências sugerem que GPIb serve para aumentar a concentração local de trombina, promovendo a interação desta com seu receptor (Coughlin, 1994). A trombina, através desses receptores ativados por proteases (PARs) acoplados a proteína G, pode regular o comportamento de várias células, além de ativar plaquetas. Recentemente, foram identificados PAR1, PAR3 e PAR4 que podem ser ativados pela trombina e PAR2 que é ativado por tripsina, mas não pela trombina. Vários estudos estão começando a definir o papel desses receptores *in vivo* (Chintala e cols., 1998; Coughlin, 1999; Wu e cols., 2000).

Diversos tipos de colágeno constituintes da região subendotelial, quando expostos devido à injúria na parede vascular, tem um importante papel na ativação de plaquetas, evento que inicia o processo de reparo da lesão (Clemetson, 1999). O colágeno, tanto monomérico como o fibrilar, induz a adesão, mas somente a adesão ao colágeno fibrilar resulta em secreção. Os quatro tipos de colágeno fibrilar encontrados no subendotélio, I e II (colágeno intersticial) e IV e V (colágeno de membrana basal), podem induzir a agregação, mas apenas os tipos I, III e IV sustentam a adesão (Siess, 1989).

Esforços para identificar o componente da membrana plasmática responsável pela adesão inicial de plaquetas as fibrilas de colágeno, tem resultado em várias respostas. Como o colágeno pode interagir com diversas proteínas, não causa surpresa o fato de que uma grande variedade de prováveis receptores, tenham sido descritos para esse agonista (Colman, 1991).

Recentemente, a glicoproteína Ia/IIa (GPIa/IIa) e glicoproteína VI (GPVI) tem recebido maior atenção. Foi demonstrado que GPVI é especificamente necessária para a ativação de plaquetas humanas por colágeno e o estímulo pelo colágeno induz a fosforilação tirosina da cadeia gama do receptor Fc (FcR) presente na plaqueta (Moroi e cols., 1989; Gibbins e cols., 1997). Segundo Tsuji e cols. (1997), os resultados da investigação da relação entre a cadeia gama de FcR (uma subunidade geradora de sinal de FcR) e GPVI indicaram que estas, associadas como um complexo, constituem um receptor de colágeno, com sinalização típica de receptores do sistema imune. Clemetson e cols. (1999) relataram a clonagem, isolamento e purificação desse receptor de plaquetas humanas, o qual pertence à superfamília imunoglobulina e tem seqüência estreitamente relacionada com FcR, conforme sugerido anteriormente.

Em um estudo, a utilização de agonistas específicos para GPVI e GPIa/IIa permitiu comparar as vias de transdução de sinal mediadas por esses receptores na plaqueta. A ativação dessas vias resultou em respostas similares: agregação, elevação de  $Ca^{2+}$  citoplasmático e fosforilação da tirosina das mesmas proteínas. Porém, ao contrário de GPVI, a maioria dos fenômenos induzidos por estimulação de GPIa/IIa foram acentuadamente inibidos pela aspirina, indicando que a transdução de sinal via GPIa/IIa e não através de GPVI, requer a produção de  $TXA_2$  (Inoue e cols., 1999).

O ácido araquidônico, exogenamente adicionado às plaquetas ou endogenamente liberado em plaquetas ativadas por outros agonistas, é metabolizado através da via ciclooxygenase e tromboxano sintase, que produz o  $TXA_2$ , um potente vasoconstritor e indutor de secreção e agregação (Siess, 1989; Fitzgerald, 1991; Okwu e cols., 1994).

Estudos farmacológicos com os ligantes, I-BOP e GR 32191, sugeriram a presença na plaqueta de dois subtipos de receptor do  $TXA_2$ , aos quais foram atribuídas funções distintas. A agregação e secreção são mediadas por receptores com baixa afinidade de ligação pelo agonista I-BOP, os quais ligam-se irreversivelmente ao antagonista GR 32191. Receptores com alta afinidade por I-BOP e que ligam-se reversivelmente a GR 32191, foram responsabilizados por alteração de forma e majoritário aumento de  $Ca^{2+}$  citoplasmático (Dorn, 1989; Takahara e cols., 1990).

Contudo, apesar dessas evidências a base molecular para a segregação funcional de subtipos farmacológicos do receptor de TXA<sub>2</sub> permanece indefinida.

Hirata e cols., (1991) relataram a clonagem do receptor de TXA<sub>2</sub> de placenta humana, que foi incluído como membro da superfamília de receptores acoplados a proteína G. Até o momento, foi clonado apenas um gene do receptor de TXA<sub>2</sub>, do qual foram identificadas as isoformas alfa e beta e os mRNA de alfa e beta foram detectados na plaqueta humana. De acordo com os resultados de um estudo, no qual foram utilizados antígenos específicos para ambas as isoformas, apenas a isoforma alfa foi detectada nas plaquetas, sugerindo que a isoforma beta é menos abundante ou não é expressa na plaqueta humana (Habib e cols., 1999).

A adrenalina, presente na circulação sanguínea, é um importante indutor de ativação plaquetária. Foi demonstrado que a adrenalina, em concentrações relativamente baixas (10 nM) *in vitro*, pode potencializar as respostas de plaquetas a outros agonistas. Níveis dessa catecolamina, aumentados pelo fumo ou estresse, podem revestir-se de importância patofisiológica na ativação plaquetária (Siess, 1989; Hjendahl e cols., 1991; Vanags e cols., 1992).

A adrenalina, do mesmo modo que o ADP, induz dois eventos independentes de ativação plaquetária: a hidrólise de fosfatidilinositol (via fosfolipase C, com mobilização de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, formação de TXA<sub>2</sub> e resultante agregação) e redução dos níveis de AMPc (através da inibição de adenilil ciclase previamente estimulada por PGI<sub>2</sub> ou PGE<sub>1</sub>). Todos esses efeitos produzidos pela adrenalina ou seja, agregação ou potencialização da agregação induzida por outros agonistas e inibição da adenilil ciclase, são mediados através da ativação de receptores alfa<sub>2</sub>-adrenérgico presentes nas plaquetas (Barrie e cols., 1990; Berlin e cols., 1991; Vanags e cols., 1992). O receptor alfa<sub>2</sub>-adrenérgico de plaqueta humana foi purificado e o gene que o codifica foi clonado, tendo a seqüência típica de um receptor acoplado à proteína G (Kobilka e cols., 1987).

As plaquetas humanas também possuem receptores beta<sub>2</sub>-adrenérgico, que ao contrário dos receptores alfa<sub>2</sub>-adrenérgico, são acoplados a estimulação da adenilil ciclase, e respondem pela inibição da função plaquetária (Hjendahl e cols., 1991).

A fração quinona por nós estudada foi capaz de inibir, de maneira dependente da concentração, a agregação induzida por todos os agonistas anteriormente mencionados, o que indica sua atuação, numa etapa do processo de ativação plaquetária, comum a esses agentes.

Face aos valores de CI50 da fração quinona, calculados para esses agonistas e com base na análise estatística dos dados, FQ manifestou potência similar ao inibir a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, adrenalina ou ácido araquidônico. Contudo, de modo significativo, FQ mostrou-se mais potente frente ao ADP em relação a trombina.

Investigando a influência do tempo de incubação sobre a inibição da agregação plaquetária, foi observado que com 5 minutos, a fração quinona já havia produzido seu efeito inibitório máximo. Por isso, esse período de tempo de incubação foi utilizado em todos os experimentos.

Alguns compostos, inclusive a aspirina (Schorr, 1997) e o clopidogrel (Herman, 1998), inibem a agregação plaquetária irreversivelmente. Ao contrário destes, o efeito inibitório produzido pela fração quinona é reversível, já que depois de inibidas, as plaquetas tiveram sua capacidade de agregação restaurada, após a lavagem para a retirada de FQ do meio de reação e posterior indução de agregação pelo agonista (trombina ou ácido araquidônico). Protopina (Ko, e cols., 1989), gingerol (Guh e cols., 1995) e girinimbina (Ko, e cols., 1994) também inibem a função plaquetária de modo reversível.

O ácido araquidônico, uma vez liberado de fosfolípidos de membrana por ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, é metabolizado via ciclooxigenase e tromboxano sintase, com resultante produção de TXA<sub>2</sub> em plaquetas (Kroll e Schafer, 1989; McNicol e Shibou, 1998). A aspirina, um bloqueador da ciclooxigenase, pode inibir a secreção e agregação irreversível produzidas por muitos agonistas, o que denota a atuação do TXA<sub>2</sub>, como mediador dessas respostas plaquetárias (Siess, 1989; Schror, 1997). O gingerol (Guh e cols., 1995) e a capsaicina (Wang e cols., 1985) são exemplos de compostos que atuam do mesmo modo que a aspirina, inibindo a agregação plaquetária.

O efeito produzido pela fração quinona sobre a função plaquetária, após sua associação com a aspirina, foi estudado utilizando PRP humano, *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, FQ potencializou a inibição da agregação produzida pela aspirina, causando o bloqueio total dessa resposta das plaquetas, quando o ácido araquidônico foi usado como agonista. Isso sugere que o mecanismo de ação de FQ pode ser semelhante ao da aspirina.

O processo de lipoperoxidação é iniciado pela incorporação de oxigênio molecular em ácidos graxos poliinsaturados, com resultante formação de hidroperóxidos. A incorporação de oxigênio pode ou não ser controlada por enzimas, o que define duas formas gerais de ocorrência desse processo. A síntese de endoperóxidos precursores de prostaglandinas e  $TXA_2$ , depende da ciclooxigenase que catalisa a introdução de oxigênio molecular em um ácido graxo poliinsaturado, particularmente o ácido araquidônico, caracterizando-se portanto, como um processo de lipoperoxidação, que sofre regulação enzimática. De outro modo, a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados não enzimática e metabolicamente desacoplada é estimulada por oxigênio reduzido, metais em transição e hidroperóxidos primariamente produzidos (Janero, 1990; Brüne e cols., 1991).

Os fatos anteriormente mencionados levaram à investigação da atividade antioxidante da fração quinona. *In vitro*, FQ mostrou-se capaz de inibir a lipoperoxidação em cérebro homogeneizado de rato, efeito determinado através da medida de malonildialdeído (MDA) e quimiluminescência.

Cabe resaltar que o MDA é um marcador da atividade da ciclooxigenase de plaquetas e a redução da produção desse metabólito do ácido araquidônico, em resposta a ativação plaquetária, correlaciona-se com o grau de inibição dessa enzima (Narjes e cols., 1997).

Face ao exposto, torna-se evidente que a propriedade antioxidante da fração quinona consiste em forte indicação adicional de sua provável interfeirência no metabolismo do ácido araquidônico (**Figura 34**), impedindo a ação da ciclooxigenase, a produção de  $TXA_2$ , com conseqüente inibição da agregação plaquetária.

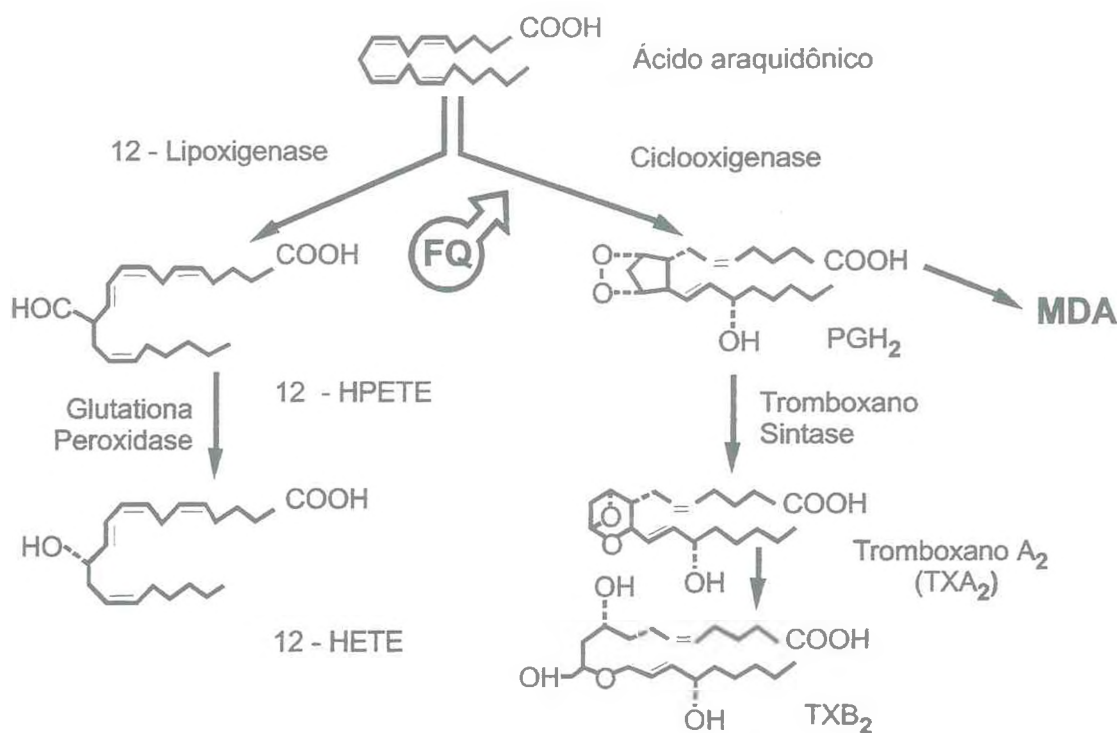


FIGURA 34 – Provável local de ação da fração quinona de *A. oncocalyx* no metabolismo oxidativo do ácido araquidônico em plaquetas (modificado de Brüne e cols, 1991).

*In vitro*, a quercetina (o flavonóide mais estudado) manifestou ação antioxidante ao prevenir a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (Formica e Regelson, 1995) e também exerceu atividade antiagregante plaquetária, impedindo a formação de TXA<sub>2</sub>, por inibição da ciclooxigenase (Tzeng e cols., 1991; Formica e Regelson, 1995).

O composto PMC, derivado do alfa-tocoferol, além de ser um potente agente antioxidante, mostrou-se capaz de inibir a agregação plaquetária, atuando como inibidor da ciclooxigenase, *in vitro* (Sheu e cols., 1999).

Vários autores relataram a atividade antiagregante plaquetária da pentoxifilina, um derivado da metilxantina (Nenci e cols., 1981; Manrique e Manrique, 1987; Rossignol e cols., 1988). Estudos *in vitro*, utilizando plaquetas humanas, mostraram que a pentoxifilina exerce essa ação, induzindo o aumento dos níveis citoplasmáticos de AMPc, através da inibição de fosfodiesterase (Ward e Clissold, 1987).

É sabido que os nucleotídeos cíclicos são importantes moduladores da função plaquetária, visto que podem regular a concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup> livre (Folts e cols., 1994). Portanto, o aumento de AMPc causa a redução da concentração citoplasmática de Ca<sup>2+</sup> e inibição da maioria das respostas de plaquetas, inclusive secreção, ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> e formação de TXA<sub>2</sub> (Kroll e Schafer, 1989; Teng e cols., 1998).

*In vitro*, foi demonstrada a atividade da fração quinona, após sua associação com a pentoxifilina, sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP humano. De modo significativo, FQ potencializou a atividade da pentoxifilina, o que indica sua possível atuação também, como inibidor de fosfodiesterase de AMPc.

De modo semelhante a FQ, cuja atividade inibitória sobre a agregação de plaquetas humanas parece envolver principalmente a inibição da ciclooxigenase e em menor grau da fosfodiesterase de AMPc, foi mostrado que a girinimbina exerce sua ação antiagregante plaquetária, inibindo ambas as enzimas, ciclooxigenase e fosfodiesterase de AMPc em plaquetas humanas (Ko e cols., 1994).

O óxido nítrico produzido pelas células do endotélio vascular inibe (via a ativação de guanilil ciclase e aumento de GMPc) as respostas de plaquetas à ativação,



inclusive adesão (De Graaf e cols., 1992), agregação (Broekman e cols., 1991) e aumento da expressão do receptor de fibrinogênio (GPIIb/IIIa) ativado (Michelson e cols., 1996).

O NO é sintetizado a partir do átomo de nitrogênio guanidino, terminal fornecido pela L-arginina (aminoácido), por ação da enzima NO sintase. Pelo menos dois tipos de NO sintase (NOS) foram identificadas: uma é constitutiva, dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina e libera NO por curto período de tempo, em resposta à estimulação de receptor e a outra, encontrada em macrófagos e leucócitos polimorfonucleares ativados, é induzível, independe de  $Ca^{2+}$  e uma vez expressa, sintetiza NO por períodos longos de tempo (Palmer e cols., 1988; Moncada e Higgs, 1991). Ambas as enzimas são inibidas *in vitro* e *in vivo* por análogos da L-arginina, tais como os compostos,  $N^G$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e  $N^G$ -monometil-L-arginina (L-NMMA). Além disso, glicocorticóides inibem a NOS induzível (NOSi), de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, mas não afetam a NOS constitutiva (NOSc), endotelial ou cerebral (Ialenti e cols., 1992).

Uma NOSc foi identificada em plaquetas humanas (Moncada e Higgs, 1991; Muragandam e Mutus, 1994; Sase e Michel, 1995). Estudos realizados por Mehta e cols. (1995) e Chen e Mehta (1996) demonstraram a presença de isoformas constitutiva e induzível de NO sintase e seus mRNA em plaquetas humanas. Chen e Mehta (1996) mostraram que a agregação de plaquetas humanas lavadas induzida por trombina foi potencializada por um inibidor de NO sintase (N Omega-nitro-L-arginina) e inibida por L-arginina. O NO derivado de plaquetas foi caracterizado pela medida de sua produção, simultaneamente com a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP humano, *in vitro* (Freedman e cols., 1997).

Em indivíduos saudáveis, a infusão sistêmica de L-arginina causou inibição da agregação plaquetária (Bode-Boger e cols., 1994) e de L-NMMA resultou em aumento da resposta de plaquetas a vários agonistas, avaliados *ex vivo* (Bodzenta-Lukaszye e cols., 1994). Tais estudos porém, não permitem a separação dos efeitos do NO derivado do endotélio daquele sintetizado nas plaquetas.



*In vitro*, tem sido mostrado que em resposta ao colágeno e outros agonistas, a agregação de plaquetas humanas (plaquetas lavadas, PRP ou sangue total) é inibida (via aumento de GMPc) por pré-incubação com L-arginina e aumentada por pré-incubação com L-NAME e L-NMMA, o que sugere o envolvimento do NO derivado de plaquetas no controle da função plaquetária (Radomski e cols., 1990a; Radomski e cols., 1990b; Anfossi e cols., 1993, Marietta e cols., 1997; Yoshimoto e cols., 1999; Anfossi e cols., 1999).

*In vitro*, foi investigada a atividade da fração quinona, após sua associação com a L-arginina, sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno em PRP humano. De acordo com os resultados obtidos, FQ não alterou de modo significativo a inibição causada pela L-arginina e portanto, provavelmente não atua via ativação de guanilil ciclase e aumento de GMPc.

*In vitro*, a fração quinona inibiu de maneira dependente da concentração, a agregação de plaquetas de rato induzida tanto por ADP como por trombina em PRP. As plaquetas humanas quando comparadas as de rato, mostraram-se mais susceptíveis aos agentes agregantes. O ADP e trombina nas concentrações de 3  $\mu\text{M}$  e 3,04 U/ml respectivamente causaram agregação plaquetária irreversível em PRP humano. Concentrações de 20  $\mu\text{M}$  de ADP e 15,8 U/ml de trombina produziram agregação reversível em PRP de ratos. Cabe ressaltar que as curvas de agregação induzidas por ADP 20  $\mu\text{M}$  e trombina 15,8 U/ml representam cerca de 90 % da resposta máxima e esta também foi reversível; com o dobro da concentração de trombina (31,6 U/ml) foi observada a coagulação do PRP.

FQ na concentração de 71,4  $\mu\text{g/ml}$  causou 70 % de inibição da agregação plaquetária induzida por ADP em PRP humano. Para produzir efeito similar em PRP de rato foi necessária uma concentração de 177,8  $\mu\text{g/ml}$ . Com a trombina, nas concentrações de 71,4 e 88,9  $\mu\text{g/ml}$ , FQ causou 46 e 28 % de inibição da agregação em PRP humano e de rato respectivamente.

Na resposta de agregação plaquetária, diferenças entre as espécies foram também relatadas por Cox e cols., (1992), Cook e cols., (1993a; 1993b). Segundo Bostwick e cols., (1996), o efeito produzido pelo composto RG13965 (antagonista de

receptor de fibrinogênio) sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno foi variável dependendo da espécie. A ordem quanto ao grau de potência foi a seguinte: [cão  $\cong$  macaco  $\cong$  humano] > [hamster  $\cong$  camundongo] > porco. Parece que *in vivo*, a dose de efeito máximo de RG13965 refletiu a dependência da espécie estabelecida *in vitro*; nos modelos de trombose em hamster e camundongo essa dose foi 30 vezes maior do que em cão.

Em concordância com os resultados que obtivemos, Takahashi (2000) mostrou que *in vitro*, o ADP e trombina induzem agregação plaquetária reversível em PRP de rato.

Visando entender alguns dos mecanismos hemostáticos em ratos, com ênfase especial nas funções das plaquetas, a resposta destas a muitos agentes agregantes foi estudada por Takahashi (2000). Este sugeriu, com base nos resultados obtidos, que apenas o ADP pode atuar como um agonista fisiologicamente importante, em ratos. Segundo esse autor, considerando que as plaquetas de rato são menos susceptíveis do que as humanas ou não respondem a trombina, colágeno, ácido araquidônico, adrenalina, serotonina, PAF e outros agentes, é questionável se elas tem um papel crítico na hemostasia. Pode-se inferir que a coagulação do sangue é da maior importância, embora as plaquetas exerçam função secundária em ratos.

Quanto ao papel das plaquetas na hemostasia e formação do trombo em ratos, esse autor formulou as seguintes hipóteses: (1) os vasos sanguíneos e tecidos sofrem lesão e os eritrócitos são danificados por colisão com os sítios de lesão; (2) o ADP é liberado dos eritrócitos; (3) o ADP induz adesão e agregação plaquetária nos sítios de lesão; (4) logo após a formação do tampão plaquetário reversível, o coágulo de fibrina, resultante da coagulação do sangue, cobre o tampão plaquetário; (5) os agregados de plaquetas, que sofrem adesão nos sítios de lesão, são estabilizados irreversivelmente através do retardo do fluxo sanguíneo e sua cobertura por redes de fibrina.

No modelo de rato, em comparação com o humano, Takahashi (2000) apontou as seguintes diferenças: (1) a agregação plaquetária é causada somente pelo ADP; (2) a adesão necessita de ADP; (3) a agregação secundária (irreversível) não ocorre e portanto a reação de liberação tem pouca importância; (4) eritrócitos são

receptor de fibrinogênio) sobre a agregação plaquetária induzida por colágeno foi variável dependendo da espécie. A ordem quanto ao grau de potência foi a seguinte: [cão  $\cong$  macaco  $\cong$  humano] > [hamster  $\cong$  camundongo] > porco. Parece que *in vivo*, a dose de efeito máximo de RG13965 refletiu a dependência da espécie estabelecida *in vitro*; nos modelos de trombose em hamster e camundongo essa dose foi 30 vezes maior do que em cão.

Em concordância com os resultados que obtivemos, Takahashi (2000) mostrou que *in vitro*, o ADP e trombina induzem agregação plaquetária reversível em PRP de rato.

Visando entender alguns dos mecanismos hemostáticos em ratos, com ênfase especial nas funções das plaquetas, a resposta destas a muitos agentes agregantes foi estudada por Takahashi (2000). Este sugeriu, com base nos resultados obtidos, que apenas o ADP pode atuar como um agonista fisiologicamente importante, em ratos. Segundo esse autor, considerando que as plaquetas de rato são menos susceptíveis do que as humanas ou não respondem a trombina, colágeno, ácido araquidônico, adrenalina, serotonina, PAF e outros agentes, é questionável se elas tem um papel crítico na hemostasia. Pode-se inferir que a coagulação do sangue é da maior importância, embora as plaquetas exerçam função secundária em ratos.

Quanto ao papel das plaquetas na hemostasia e formação do trombo em ratos, esse autor formulou as seguintes hipóteses: (1) os vasos sanguíneos e tecidos sofrem lesão e os eritrócitos são danificados por colisão com os sítios de lesão; (2) o ADP é liberado dos eritrócitos; (3) o ADP induz adesão e agregação plaquetária nos sítios de lesão; (4) logo após a formação do tampão plaquetário reversível, o coágulo de fibrina, resultante da coagulação do sangue, cobre o tampão plaquetário; (5) os agregados de plaquetas, que sofrem adesão nos sítios de lesão, são estabilizados irreversivelmente através do retardo do fluxo sanguíneo e sua cobertura por redes de fibrina.

No modelo de rato, em comparação com o humano, Takahashi (2000) apontou as seguintes diferenças: (1) a agregação plaquetária é causada somente pelo ADP; (2) a adesão necessita de ADP; (3) a agregação secundária (irreversível) não ocorre e portanto a reação de liberação tem pouca importância; (4) eritrócitos são

extremamente frágeis, contem uma grande quantidade de ADP e o plasma tem forte atividade ADPase; (5) a atividade de coagulação intrínseca é alta e a formação do coágulo de fibrina é rápida. Anteriormente, Maffrand e cols., (1988) já haviam apontado um papel chave para o ADP na hemostasia em ratos.

Entre outras razões, diferenças fundamentais nos mecanismos hemostáticos entre humanos e ratos, relatadas por Sekiya e cols., (1990), Maffrand e cols., (1988) e Takahashi (2000), talvez possam explicar o fato de não ter sido observado o efeito inibitório de FQ sobre a agregação de plaquetas de ratos, nos estudos ex vivo.

Nas doses de 10, 30 e 60 mg/kg, i.p., administradas 1 vez ao dia, durante 5 dias, em ratos, nenhum efeito significativo foi produzido pela fração quinona sobre a agregação plaquetária induzida por ADP em PRP, preparado a partir de amostras de sangue colhidas dos animais, 30 minutos após a última injeção da fração.

Na dose de 50 mg/kg, v.o., administrada 1 vez ao dia, durante 15 dias, em ratos, FQ não causou alteração significativa na agregação plaquetária induzida por ADP em PRP, obtido de amostras de sangue colhidas dos animais no 7º e 15º dia, com 1 h após a ingestão da fração. Esse tratamento também não produziu qualquer modificação significativa sobre o número de plaquetas e outros parâmetros hematológicos e bioquímicos desses animais.

O sangramento devido à incisão na cauda de rato pode ser um exemplo de hemorragia e hemostasia provocadas por injúria mecânica e o tempo de sangramento pode ser considerado como um indicador da atividade hemostática total (Takahashi, 2000).

Segundo De Gaetano e cols., (1977), a inibição da agregação plaquetária causada por ADP, mas não pelo colágeno, determina o prolongamento do tempo de sangramento em ratos.

De acordo com Maffrand e cols., (1988), a ativação de plaquetas durante a hemostasia primária em ratos, envolve o ADP e é sensível a defeitos, na função da plaqueta dependente de ADP ou na coagulação.

Tanaka e cols., (1998) relataram que o tempo de sangramento em ratos não foi alterado pela aspirina ou pelo composto Z-335 (antagonista do receptor de TXA<sub>2</sub>), mas

foi significativamente prolongado pela ticlopidina (antagonista do receptor de ADP). Esses dados indicam que na hemostasia primária em ratos, o TXA<sub>2</sub> parece não estar envolvido, enquanto que o ADP pode ter um papel importante. O aumento do tempo de sangramento em ratos por ticlopidina e clopidogrel também foi demonstrado por Takahashi e cols., (2000).

Wang e cols., (1985) mostraram que capsaicina (inibidor da ciclooxigenase) prolongou o tempo de sangramento provocado por incisão na cauda de camundongos e esse efeito foi similar ao da aspirina e indometacina. Esses resultados foram contrários àqueles obtidos por Tanaka e cols., (1998) em ratos.

Segundo Bostwick e cols., (1996) o composto RG13965 mostrou-se capaz de inibir a formação do trombo sem alterar o tempo de sangramento em cães, diferindo de muitos outros antagonistas do receptor de fibrinogênio, que em doses eficazes contra modelos de trombose também prologam o tempo de sangramento. Há relatos de outros agentes antitrombóticos que exibem eficácia máxima em doses que não aumentam o tempo de sangramento Tschopp e cols., (1993) e Collen e cols., (1994).

De modo surpreendente, a fração quinona causou diminuição significativa do tempo de sangramento em camundongos, nas doses de 30 mg/kg, i.p. (3 h após a administração), 100 mg/kg, v.o. (3 h após a ingestão) e 200 mg/kg, v.o. (3 h após a ingestão). Conforme os resultados experimentais apresentados, FQ causou a constrição em preparações de aorta de rato, na mesma faixa de concentração em que inibiu a agregação de plaquetas desses animais *in vitro*. Esse fato pelo menos em parte, pode explicar a diminuição do tempo de sangramento em camundongos por essa fração.

A fração quinona nas doses de 30 e 60 mg/kg, i.p. administradas uma única vez em camundongos não produziu nenhum efeito significativo no número de plaquetas em sangue colhido desses animais, 3 h após o tratamento.

Na literatura especializada, encontramos numerosos artigos que relatam a atividade antioxidante de extratos de plantas (Maitra e cols., 1995; Ismail e cols., 1997; Colak e cols., 1998; Shi e Niki, 1998; Kumar e Muller, 1999) e constituintes químicos isolados (Ferrandiz e cols., 1994; Prasad e cols., 1995; Joyeux e cols., 1995; Houghton e cols., 1995; Wiseman e cols., 1996; Chiu e cols., 1997; Fraga e cols.,

1997; Fuhrman e cols., 1997; Manna e cols., 1997), o que denota o grande interesse atual por esse tema.

A análise dos dados revelou que dentre vários grupos de compostos, as quinonas foram citadas por sua propriedade antioxidante. O óleo fixo bruto e a timoquinona pura, obtidos das sementes de *Nigella sativa*, espécie vegetal tradicionalmente empregada no tratamento de reumatismo e outras doenças inflamatórias relacionadas, foram testados como possíveis inibidores da síntese de eicosanóides e peroxidação lipídica de membrana. Ambos inibiram as vias ciclooxigenase e 5-lipooxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em leucócitos de peritônio de rato estimulados com ionóforo de cálcio A23187, como demonstrado pela redução dose-dependente dos níveis de tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), metabólito estável TXA<sub>2</sub> e leucotrieno B<sub>4</sub> respectivamente. O óleo fixo e a timoquinona também inibiram a peroxidação não enzimática de fosfolípidos de lipossomos de cérebro de rato. Nas duas situações a timoquinona mostrou-se mais potente (Houghton e cols., 1995).

Segundo Tripathi e cols., (1995) o estudo fitoquímico do extrato alcóolico da raiz de *Rubia cordifolia* Linn (Rubiacea), erva de distribuição ampla na região do Himalaia indicou a presença de antraquinona e naftoquinona, como seus principais constituintes. Em homogeneizado de fígado de rato, esse extrato mostrou-se capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida por hidroperóxido cumeno.

Diferentes iniciadores do processo de peroxidação lipídica foram utilizados para determinar a atividade antioxidante de uma hidroquinona, avarol e sua quinona, avarona, produtos naturais de origem marinha. Com todos os iniciadores testados, ambos os compostos mostraram-se capazes de inibir a lipoperoxidação. (Belisario e cols., 1992). Em plaquetas humanas (plaquetas lavadas e PRP), frente a diferentes agonistas, o avarol e a avarona manifestaram atividade antiagregante plaquetária, através da inibição da produção de TXA<sub>2</sub> (Belisario e cols., 1996).

A idebenona [2,3-dimetoxi-5-metil-6-(10-hidroxidecil)-1,4-benzoquinona], análogo sintético da coenzima Q, é atualmente empregada no tratamento de doenças vascular e degenerativa do sistema nervoso central (Gillis e cols., 1994). Apesar do

uso clínico, seu mecanismo de ação permanece desconhecido. Alguns autores tem atribuído o efeito neuroprotetor da idebenona a sua capacidade antioxidante. De fato, esse composto mostrou-se capaz de inibir a peroxidação lipídica em membranas de mitocôndria submetida a estresse oxidativo (Suno e Nagaoka, 1984). Além disso, pode inativar diversos radicais livres, inclusive os radicais peroxila e tirosila e o peroxinitrito (Mordente e cols., 1998). Suno e cols., (1989) relataram a atividade antiagregante plaquetária da idebenona. Em ratos, esse fármaco preveniu déficits de memória e aprendizagem causados pela infusão intracerebroventricular contínua do peptídeo  $\beta$ -amilóide, citotóxico, o qual é o principal componente das placas senis presentes no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer (Yamada e cols., 1999).

A ubiquinona e a vitamina K são quinonas que ocorrem nos sistemas biológicos e atuam como componente redox de cadeias de transporte de eletrons transmembrana. O ubiquinol e a hidroquinona da vitamina K são os produtos de redução, de 2 eletrons, da ubiquinona e vitamina K respectivamente (Mukai e cols., 1993).

O ubiquinol mostrou-se potente inibidor do processo lipoperoxidação, em diferentes sistemas biológicos, tais como: mitocôndria e microsossomos (Kagan e cols., 1990), lipossomos (Landi e cols., 1992) e lipoproteína de baixa densidade (Merati e cols., 1992). Além disso, é capaz de inativar radicais peroxila de lipídeo e regenerar o alfa-tocoferol, reduzindo o radical alfa-tocoferoxila (Mukai e cols., 1993). Esses dados revelam a propriedade antioxidante desse composto.

Segundo Mukai e cols., (1993), a hidroquinona da vitamina K atua como um antioxidante, inativando vários radicais livres. O estudo realizado por Vervoot e cols., (1997) testou a atividade antioxidante potencial do ciclo da vitamina K. A forma hidroquinona da vitamina K, cofator da enzima gama-glutamil carboxilase, é continuamente regenerada nesse ciclo e as vias envolvidas são a oxidação da hidroquinona a epóxido, seguida por redução à quinona e posterior redução à hidroquinona. De acordo com os resultados obtidos, o ciclo da vitamina K inibiu a peroxidação lipídica em microsossomos de fígado de rato e a espécie química ativa foi a hidroquinona da vitamina K.

O composto alfa-tocoferila quinona é um metabólico ativo do alfa-tocoferol, produzido *in vivo*, nos sítios de ocorrência do estresse oxidativo. Recentemente, foi demonstrada a capacidade antioxidante da sua forma reduzida, alfa-tocoferila hidroquinona (Siegel e cols., 1997; Shi e cols., 1999). Em lipoproteína de baixa densidade (LDL) exposta a diferentes indutores da formação de radicais livres, a alfa-tocoferila hidroquinona inibiu acentuadamente o processo de lipoperoxidação ou impediu a sua ocorrência (Neuzil e cols., 1997).

No presente estudo, a propriedade antioxidante da fração quinona *in vitro* revelou-se através da sua capacidade de inibir a lipoperoxidação que ocorre espontaneamente, quando o homogeneizado de cérebro de rato é incubado sob condições controladas, conforme o método de Stocks e cols., (1974). Nesse sistema, originalmente proposto como modelo para medir a atividade antioxidante de fluidos biológicos (soro, líquido cefalorraquidiano entre outros), a lipoperoxidação ocorre em alto grau e de forma reprodutível, sob condições padronizadas simples. Isto somado a considerações práticas, tais como a facilidade de obter quantidades relativamente grandes de material (cérebro de rato fresco) e a simplicidade de iniciação do processo de lipoperoxidação (não requer catalizador estranho), levaram a escolha desse método. A produção de TBARS e a emissão de QL foram os parâmetros empregados para a avaliação do grau de lipoperoxidação.

Com base na literatura revisada, a lipoperoxidação é o dano oxidativo mais utilizado para o estudo da atividade antioxidante de compostos químicos, *in vivo* e *in vitro*.

Vários métodos químicos e físicos foram descritos para medir a peroxidação lipídica em tecidos homogeneizados (Prasad e cols., 1996; Barros e cols., 1996; Siu e cols., 1998), células ( Videla e cols., 1984; Manna e cols., 1997), frações subcelulares microssomal (Ursini e cols., 1994; Fraga e cols., 1997) e mitocondrial (Chiu e cols., 1997), membrana de lipossomos (Houghton e cols., 1995; Kumar e Muller, 1999) e LDL (Viana e cols., 1996; Fuhrman e cols., 1997).

Uma maneira direta de avaliar esse processo seria através da determinação quantitativa de hidroperóxidos, produtos iniciais primários que resultam do ataque de



radicais livres a ácidos graxos poliinsaturados. Porém, na prática, isso é difícil devido à natureza lábil desses compostos. Consequentemente, a lipoperoxidação é medida por métodos indiretos ou seja pela análise de produtos finais ou secundários derivados do metabolismo ou decomposição de hidroperóxido (Janero, 1990).

Tais métodos incluem a determinação de malonildialdeído (MDA), medida de dienos conjugados por absorção ultravioleta, análise de produtos fluorescentes, determinação da formação de etano e pentano, detecção de quimiluminescência, medida do consumo de oxigênio, análise de peróxidos lipídicos e avaliação da perda de ácidos graxos poliinsaturados de fosfolipídeos da membrana. Dentre estes, o teste TBA, ou seja, a determinação do MDA com base na sua reatividade com o ácido tiobarbitúrico (TBA), tem sido o mais usado (Valenzuela, 1991).

Os fatos que determinaram o uso rotineiro do teste TBA, para detectar e quantificar a lipoperoxidação em uma grande variedade de amostras, são mencionados a seguir. O MDA é gerado como um produto secundário na biossíntese de eicosanóides (peroxidação lipídica controlada por enzimas) e como um produto final da degradação oxidativa, não enzimática e metabolicamente desacoplada de ácidos graxos poliinsaturados (Smith, 1989; Girotti, 1995). Sob condições de incubação apropriadas (meio ácido e temperatura elevada) o MDA participa prontamente de uma reação de adição nucleofílica com o TBA, da qual resulta um pigmento de cor rosa intensa, estável, com alta absorvidade molar no espectro visível e absorbância máxima de 532 a 535nm (Sinnhuber e Yu, 1958). A estrutura desse composto, um produto de condensação 1:2 MDA: TBA, foi estabelecida por Nair e Turner (1984). Finalmente, a determinação quantitativa do MDA, através da medida espectrofotométrica de seu derivado, o 1:2 MDA: TBA, é um método sensível, rápido e pouco dispendioso (Janero, 1990; Valenzuela, 1991).

Cabe ressaltar que o teste TBA tem algumas limitações bem conhecidas hoje, as quais quando não consideradas podem levar a resultados errôneos. Em tais circunstâncias, os seguintes fatores se revestem de importância: a influência das condições de reação e dos reagentes na resposta do teste, a inespecificidade da reatividade do TBA com o MDA e a inabilidade da espectrofotometria para, sozinha,

distinguir o real derivado 1:2 MDA: TBA de outros compostos similares produzidos no teste. Essas interferências levaram alguns autores a usar a expressão “thiobarbituric acid reactive substances” (TBARS) para traduzir seus resultados, assumindo que o principal componente é o composto 1:2 MDA: TBA (Janero, 1990; Valenzuela, 1991).

Face ao exposto, torna-se evidente que o emprego do teste TBA em estudos de lipoperoxidação, especialmente em sistemas biológicos, exige prudência. Visto que os resultados obtidos por esse método não são inequívocos, impõe-se a necessidade de incluir na avaliação, outros indicadores da formação e decomposição de peróxido graxo, como um procedimento complementar (Janero, 1990; Valenzuela, 1991).

Em diversas amostras biológicas, a lipoperoxidação tem sido avaliada através da emissão de luz (Piergiacomi e cols., 1996; Desmarchelier e cols., 1997; Afanas'ev e cols., 1998; Albertini e Abuja, 1998; Gulaya e cols., 1998; Vasiljeva e cols., 1998; Yesilkaya e cols., 1998). Lissi e cols., (1986) relataram que a quimiluminescência correlaciona-se bem com outros ensaios de lipoperoxidação como o acúmulo de TBARS e a produção de alcanos e por isso, pode ser usada com vantagem para monitorar o grau de lipoperoxidação e o efeito de aditivos no processo. De fato, a avaliação da lipoperoxidação através da determinação de TBARS e QL, como procedimentos complementares, é uma prática bastante usada (Videla e cols., 1997; Davino e cols., 1998; Desmarchelier e cols., 1998; Desmarchelier e cols., 1999; Kawagoe e Nakagawa, 2000). Além disso, a combinação da medida de QL e dienos conjugados foi empregada para a avaliação da lipoperoxidação em LDL (Albertini e cols., 1999).

No presente estudo, os resultados mostraram que a fração quinona causou inibição concentração-dependente da peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro de rato. Os valores 1,64 e 2,06  $\mu\text{g/ml}$ ,  $Q_{1/2}$  de FQ calculados com os dados obtidos através da determinação de TBARS e QL respectivamente, são muito próximos. Lissi e cols. (1986) já haviam relatado que a produção de TBARS e a emissão de luz, quando integrados, exibem respostas similares. Barros e cols. (1996) demonstraram o efeito inibitório de 4-neurolidilcatecol (composto isolado da espécie vegetal *Pothomorphe umbellata* L. Miq.) sobre a lipoperoxidação em homogeneizado

de cérebro de rato, comparando-o com o do alfa-tocoferol. Valores semelhantes de  $Q_{1/2}$  também foram observados. Esses valores via TBARS e QL foram 0,75 e 0,68  $\mu\text{M}$  respectivamente para o 4-neurolidilcatecol e 14,40 e 10,90  $\mu\text{M}$  (ou 6,20 e 4,69  $\mu\text{g/ml}$ ) respectivamente para o alfa-tocoferol. Visto que os métodos utilizados e as condições de trabalho foram as mesmas, os valores,  $Q_{1/2}$  de FQ via TBARS e QL, puderam ser comparados com os relatados por Barros e cols., (1986) para o alfa-tocoferol, o qual é reconhecidamente um importante antioxidante natural (Gaté e cols., 1999). Se quanto menor o valor de  $Q_{1/2}$ , maior é a capacidade antioxidante, então FQ mostrou-se ainda mais potente do que o alfa-tocoferol.

Demonstrada a atividade antioxidante da fração quinona *in vitro*, esta foi também investigada *in vivo*. Para tanto, foi utilizado o modelo de hepatotoxicidade aguda induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos, no qual estão envolvidos: radicais livres e lipoperoxidação (Mitcheva e cols., 1993; Murakami e cols., 1998).

O  $\text{CCl}_4$  é biotransformado pelo sistema oxidase de função mista, no retículo endoplasmático do fígado e a clivagem da ligação cloro - carbono resulta na formação do radical livre triclorometil, que é instável e pode reagir prontamente com componentes da membrana ou com o oxigênio molecular para formar o radical triclorometilperoxila, que parece ser ainda mais reativo do que o seu precursor (Lin e cols., 1997). Os radicais livres gerados podem formar ligações covalentes ou abstrair um átomo de hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados da membrana, resultando na produção de radicais livres de lipídeo. Estes reagem com o oxigênio molecular, o que inicia a decomposição peroxidativa de lipídeos, no retículo endoplasmático. O processo de lipoperoxidação resulta na liberação de produtos solúveis que afetam outras membranas, como a membrana plasmática da célula (Tsai e cols., 1997).

As enzimas alanina amino transferase (ALT/GPT) e aspartato amino transferase (AST/GOT) estão localizadas no citoplasma e são liberadas na circulação sanguínea por injúrias que comprometem a integridade estrutural do fígado. Desse modo, o aumento dos níveis dessas enzimas no soro, quando o  $\text{CCl}_4$  é administrado, é um indicador preciso da ocorrência de lesão celular (Mitcheva e cols., 1993; Gilani e cols., 1998). Segundo Lin e cols. (1997), a AST ocorre no fígado, músculo cardíaco,

músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos (em ordem decrescente de concentração), enquanto a ALT está presente em maior concentração no fígado. Nas células, a AST é encontrada no citosol e mitocôndria e a ALT apenas no citosol. De acordo com esses autores, para a avaliação de dano hepatocelular, agudo, a determinação da atividade de ALT é um teste mais sensível e específico do que a análise de AST. Os resultados obtidos demonstraram que a fração quinona causou inibição significativa, apenas da atividade de ALT. As doses crescentes testadas produziram efeitos similares e a inibição máxima, observada com FQ 30 mg/kg, foi de 29 % em relação ao grupo tratado somente com o CCl<sub>4</sub>.

Os dados referentes à observação histopatológica indicaram uma ação protetora, muito discreta do tratamento com a fração quinona. Embora a dose de CCl<sub>4</sub> utilizada pudesse causar necrose hepática em ratos, tal efeito não foi observado. Provavelmente, contribuiu para isso o fato de os animais terem sido alimentados normalmente, antes e durante o experimento. Com o objetivo de estudar a degeneração das células hepáticas em condições menos severas, Merino e cols., (1996), utilizando o CCl<sub>4</sub> em dose capaz induzir necrose, relataram ter alimentado os animais antes e durante todo o experimento com o propósito de prevenir a ocorrência desse efeito. Esses autores demonstraram o efeito hepatoprotetor do própolis, através da determinação de ALT no soro e medida do grau de esteatose. Utilizando um programa de computador para medir a extensão da área de esteatose, não foi observada diferença entre os grupos tratados com o própolis e aquele que recebeu apenas o CCl<sub>4</sub>. A redução da esteatose pelo própolis somente se revelou através de reação histoquímica para lipídeos e dosagem de triglicérides no fígado. Tendo em vista esses dados, merece consideração o fato de que efeitos de menor intensidade podem passar despercebidos ou ser subestimados, quando a esteatose é submetida apenas à avaliação qualitativa, utilizando a técnica de coloração dos cortes histopatológicos por hematoxilina-eosina.

Nos grupos de animais tratados com a fração quinona, os níveis de lipoperoxidação induzidos pelo CCl<sub>4</sub> no tecido hepático manifestaram apenas uma

tendência à diminuição. Com FQ nas doses de 10 e 30 mg/kg, i.p., a redução foi de 13 e 15 % respectivamente em relação ao grupo.

Face ao exposto, caracterizou-se a necessidade de dados complementares para uma avaliação conclusiva do efeito da fração quinona na hepatotoxicidade induzida pelo CCl<sub>4</sub>. Por isso foi usado o modelo experimental de prolongamento pelo CCl<sub>4</sub>, do tempo de sono induzido por pentobarbital. Os danos conferidos pelo CCl<sub>4</sub>, tanto ao hepatócito quanto às enzimas microsômicas do sistema oxidase de função mista, comprometem o processo de biotransformação de fármacos pelo fígado (Javatilaca e cols., 1990). De modo significativo, o tratamento prévio dos animais com a fração quinona reduziu o prolongamento pelo CCl<sub>4</sub> do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos, confirmando seu efeito hepatoprotetor. As doses de 10 e 30 mg/kg, i.p. produziram efeitos similares e a inibição máxima, observada com a dose de 10 mg/kg, foi de 45 % em relação ao grupo tratado somente com o CCl<sub>4</sub>. Os valores de inibição foram 19 e 29 % com as doses de 100 e 200 mg/kg, v.o. respectivamente. Dessa maneira, FQ mostrou-se mais potente, quando administrada por via intraperitoneal. A variação entre espécies, da suscetibilidade a agentes químicos, pode explicar pelo menos em parte o efeito hepatoprotetor mais intenso de FQ observado em camundongos.

Segundo Lin e cols., (1998), os compostos que protegem o fígado de danos causados pelo CCl<sub>4</sub>, o fazem exercendo sua atividade antioxidante ou evitando a ocorrência de peroxidação lipídica induzida pelo CCl<sub>4</sub>, impedindo a formação de radicais livres.

Os inibidores das enzimas microsômicas do sistema oxidase de função mista hepático atuam inibindo a bioativação do CCl<sub>4</sub> em sua espécie reativa, o radical triclorometil (Castro e cols., 1974). Gilani e cols., (1998) relataram que a duração do sono induzido por pentobarbital em animais é considerada um indicador confiável da atividade das enzimas microsômicas do sistema oxidase de função mista hepático. Os produtos que resultam da biotransformação do pentobarbital por esse sistema são inativos e portanto, qualquer fármaco capaz de inibir a atividade dessas enzimas deverá prolongar o tempo de sono induzido pelo pentobarbital. Nas doses testadas, por

vias intraperitoneal e oral, a fração quinona não prolongou o tempo de sono induzido pelo pentobarbital. Isso indica que FQ não altera a atividade das enzimas do sistema oxidase de função mista.

A inflamação tem um papel central na hepatotoxicidade aguda causada por compostos químicos e portanto os agentes antiinflamatórios podem oferecer proteção contra os danos agudos induzidos pelo  $\text{CCl}_4$  (Perez-Alvarez e cols., 1993).

A inflamação é a resposta do organismo, especialmente dos tecidos vascularizados, a injúria que pode ser causada por agentes químicos, físicos ou biológicos (microorganismos). Trata-se de um processo muito complexo, com atuação de numerosos mediadores de origem plasmática e celular (Kehrer, 1993).

A primeira fase da inflamação, denominada aguda, tem curta duração e compreende as seguintes etapas: 1) dilatação dos pequenos vasos adjacentes à área de lesão tecidual, tornando mais lento o fluxo sanguíneo através deles, 2) aumento da permeabilidade vascular e formação do exsudato fluido, contendo pequenas proteínas plasmáticas e 3) formação do exsudato celular por migração de leucócitos predominantemente neutrófilos para o foco inflamatório (Kuehl e Egan, 1980; Mackay e cols., 1985).

Uma resposta efetiva do hospedeiro à infecção ou dano tecidual requer o acúmulo de leucócitos no foco inflamatório. Essas células realizam a fagocitose de agentes lesivos, matam bactérias, degradam tecidos necrosados e antígenos estranhos (Bevilacqua e cols., 1994). O movimento de neutrófilos do lume do vaso para a área de lesão é um processo complexo que obedece a estímulos quimiotáticos. Dentre outros, destacam-se em importância os seguintes agentes quimiotáticos: produtos bacterianos e os mediadores endógenos, quinto componente do sistema complemento ( $\text{C5a}$ ), leucotrieno  $\text{B}_4$  e citocinas, particularmente quimiocinas (peptídeo ativador de neutrófilos 1, peptídeo ativador de neutrófilos 2 e peptídeo estimulador do crescimento de melanócitos) da família da interleucina 8 (Whaley e Ferguson, 1981; Ribeiro e cols., 1991; Rot, 1992).



Quando o processo inflamatório não é resolvido, por eliminação do agente lesivo na fase aguda, ocorre então a fase crônica que em geral tem longa duração (Kuehl e Egan, 1980; Mackay e cols., 1985).

A atividade antiinflamatória de FQ foi investigada utilizando os modelos de inflamação aguda, edemas induzidos por injeção de carragenina e dextrano na pata de rato.

A carragenina (polissacarídeo sulfatado) é o agente flogístico de escolha para a investigação da atividade antiinflamatória de compostos químicos por depender inteiramente de um estímulo local, não apresentar potencial antigênico, não produzir efeitos sistêmicos, manifestar um elevado grau de reprodutibilidade e sua ação poder ser inibida por antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (Winter e cols., 1962). Com base na literatura revisada, o edema induzido por carragenina na pata de rato tem sido largamente utilizado na pesquisa de novos agentes antiinflamatórios.

Willoughby e cols., (1969) relataram a possível atuação do sistema complemento como um mecanismo indutor do processo inflamatório agudo. Willis (1969) apontou o envolvimento de vários mediadores, inclusive histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), cininas e prostaglandinas no edema causado por carragenina. Esses fatos estimularam Di Rosa e cols., (1971) a investigar a atuação do sistema complemento e reavaliar o papel desses mediadores no edema induzido por carragenina na pata de rato. Os resultados obtidos demonstraram a participação do sistema complemento, do início ao fim, na reação inflamatória. Quanto aos mediadores envolvidos, 3 etapas foram distinguidas: a inicial (correspondendo aos primeiros 90 min), com liberação concomitante de histamina e 5-HT, a segunda (de 90 a 150 min), mediada por cininas e finalmente a terceira (a partir de 150 min), com atuação de prostaglandinas. Todos esses mediadores mostraram ser dependentes do sistema complemento para o exercício de sua atividade. Evidências indicaram a histamina e 5-HT como responsáveis pela ocorrência de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na etapa inicial do processo inflamatório.

A bradicinina tem sido implicada nas reações inflamatórias agudas devido a sua habilidade de induzir o aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos para

componentes do plasma. Seu envolvimento no edema induzido por carragenina na pata de rato foi demonstrado por Ronald e Christopher (1990) e Damas e Remacle-Volon (1992), utilizando antagonistas de receptor dessa cinina.

Outra característica do edema induzido por carragenina na pata de rato é a infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares observada na terceira etapa (Di Rosa e Willoughby, 1971 e Ialenti e cols., 1992).

O edema induzido por dextrano (polissacarídeo sulfatado) na pata de rato envolve a degranulação de mastócitos e portanto resulta principalmente da liberação de histamina e 5-HT. A reação inflamatória causada por dextrano difere daquela provocada por carragenina, visto que é caracterizada pela presença de um número pequeno de leucócitos no exsudato (Di Rosa e Willoughby, 1971; Ialenti e cols., 1992 e Masso e cols., 1993).

Segundo Ialenti e cols., (1992), a histamina, 5-HT, e bradicinina são capazes de induzir a liberação de óxido nítrico das células do endotélio vascular *in vitro*, por um mecanismo que envolve a ocupação de receptor seguida por estimulação da enzima NO sintase constitutiva. Adicionalmente, macrófagos produzem NO quando ativados por lipopolissacarídeos ou citocinas.

Considerando que existem todas as condições para a formação de NO no sítio de uma reação inflamatória aguda, esses autores estudaram o efeito da L-arginina e de inibidores da NO sintase (L-NAME e L-NMMA) no aumento da permeabilidade vascular induzida por carragenina na pele de rato e nos edemas induzidos por carragenina e dextrano na pata de rato. L-NAME e L-NMMA inibiram o aumento da permeabilidade vascular e a formação dos edemas. L-arginina aumentou essas respostas inflamatórias e mostrou-se capaz de reverter os efeitos de L-NAME e L-NMMA. Para investigar o envolvimento da enzima NO sintase induzível foram utilizados ratos tratados com dexametasona (inibidor da NOSi). L-arginina aumentou a reação inflamatória ao dextrano, durante todo período de sua duração e as primeiras fases do edema induzido por carragenina. Neste, a L-arginina não modificou a inibição causada pela dexametasona na última fase. Esses dados sugerem que NO endógeno é liberado no local de inflamação aguda e modula a formação do edema. Dependendo do



tempo decorrido ou do tipo de reação inflamatória o NO pode ser predominantemente gerado pela NOS<sub>c</sub> ou NOS<sub>i</sub>.

Em concordância com os resultados anteriormente mencionados, Salvemini e cols., (1996a) apontaram o NO como um importante mediador do edema induzido por carragenina e sugeriram que na sua produção a NOS<sub>c</sub> atua nas etapas iniciais, de desenvolvimento do edema e a NOS<sub>i</sub> está envolvida na última etapa, de manutenção da reação inflamatória.

Uma vez que o NO é um importante vasodilatador, seu envolvimento durante uma resposta inflamatória pode estar relacionado a sua habilidade de aumentar a permeabilidade vascular e o edema, através de alterações no fluxo sanguíneo local (Moncada e Higgs, 1991). Além disso, o NO mostrou-se capaz de aumentar a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias, por ativação de ambas as isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), *in vitro* e *in vivo* (Salvemini e cols., 1993; Sautebin e cols., 1995; Salvemini e cols., 1995). A isoforma induzível da ciclooxigenase (COX-2) foi apontada por Siebert e cols., (1994) como responsável pela elevada produção de prostaglandinas, observada na última etapa do edema induzido por carragenina na pata de rato.

Um possível mecanismo pelo qual o NO produz injúria tecidual é através de sua interação com o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um potente agente oxidante, capaz de induzir peroxidação lipídica e dano celular, cuja formação tem sido proposta em diversos processos patológicos associados com a produção excessiva de NO e  $O_2^-$  (Beckman e cols., 1990 e Rubbo e cols., 1994). Segundo Boughton-Smith e cols., (1993), a ativação e infiltração local de neutrófilos contribuem para a reação inflamatória induzida por carragenina na pata de rato, produzindo entre outros mediadores, os radicais livres de oxigênio: hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e  $O_2^-$ . Salvemini e cols., (1996b) demonstraram a produção de NO,  $O_2^-$  e  $ONOO^-$  nesse modelo de inflamação.

Segundo Cuzzocrea e cols., (1997), a melatonina é capaz de inibir a produção de NO e eliminar radicais livres de oxigênio e  $ONOO^-$ , *in vitro*. Considerando que esses compostos desempenham um importante papel no processo inflamatório

induzido por carragenina na pata de rato, esses autores investigaram os efeitos da melatonina nesse modelo. Os resultados obtidos revelaram uma potente atividade antiinflamatória da melatonina, com inibição da produção de NO e inativação de radicais livres de oxigênio e ONOO<sup>-</sup> *in vivo*.

O edema induzido por carragenina na pata de rato foi novamente utilizado por Cuzzocrea e cols., (1998) para demonstrar a inibição da produção de NO e inativação de radicais livres de oxigênio e ONOO<sup>-</sup> por mercaptoetilguanidina, um composto que em estudos anteriores mostrou-se capaz de produzir esses efeitos *in vitro*.

Tendo em vista suas ações, antiagregante plaquetária e antioxidante, demonstradas no presente estudo, a fração quinona produziu o efeito esperado no edema induzido por injeção de carragenina na pata de rato. Guardando a relação dose-resposta, FQ inibiu o edema quando administrada por via intraperitoneal ou oral. Respostas similares foram observadas com as doses de 30 e 10 mg/kg, i.p., demonstrando que a última já produz efeito máximo. A inibição foi significativa na 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora após a administração do agente flogístico, quando ocorrem a liberação de bradicinina, acúmulo de prostaglandinas e infiltração de leucócitos polimorfonucleares, com produção de radicais livres de oxigênio e outros mediadores por essas células. Considerando as vias de administração testadas (intraperitoneal e oral) as doses eficazes por via intraperitoneal foram menores, indicando que a absorção oral de FQ é menos eficiente. Uma dose de 200 mg/kg, v.o. foi necessária para a inibição significativa do edema por FQ, na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> hora após a injeção de carragenina.

Após a administração intraperitoneal, a fração quinona também inibiu de modo dose-dependente o edema induzido por injeção de dextrano na pata de rato. A inibição nas doses de 10 e 30 mg/kg foi significativa a partir da 2<sup>a</sup> e 1<sup>a</sup> hora respectivamente, após a injeção de dextrano.

A inflamação aguda ou crônica é um modelo de nocicepção (Besson, 1997) e a pesquisa sobre dor inflamatória tem mostrado que mediadores inflamatórios podem gerar impulsos nociceptivos (Steen e cols., 1996; Besson, 1997). Desse modo, foi estabelecido que a bradicinina e serotonina são capazes de excitar nociceptores

cutâneos e observou-se que a serotonina pode aumentar pronunciadamente a resposta de nocicepção à bradicinina (Lang e cols., 1990; Rueff e Dray, 1993). Também as prostaglandinas, embora ineficazes na ativação de nociceptores podem promover a sensibilização destes para a bradicinina em alguns tecidos (Schaible e Schmidt, 1988). Além disso, foi demonstrado o papel de neuropeptídeos, especialmente substância P na ativação da inflamação neurogênica (Steen e cols., 1996). Evidências recentes apontam a contribuição de citocinas, inclusive do fator alfa de necrose tumoral (TNF alfa), na geração e manutenção da hiperalgesia que acompanha a dor neuropática (Jungler e Sorokin, 2000). A grande diversidade de todos esses compostos interagindo torna o tratamento farmacológico da dor muito complexo.

A redução da inflamação pelo uso de fármacos antiinflamatórios sempre resulta em alívio da dor por significantes períodos de tempo. Além disso, a maioria dos analgésicos não opióides (aspirina e outros) também exercem efeito antiinflamatório (antiinflamatórios não esteroidais) e são portanto adequados para o tratamento de condições inflamatórias aguda e crônica (Payan e Katzung, 1995).

Com base nesses fatos e considerando a atividade antiedematogênica manifestada pela fração quinona foi investigada sua propriedade analgésica. Ao utilizar testes de comportamento nociceptivo, impõem-se a necessidade de aplicar vários desses ensaios, diferentes quanto a qualidade, intensidade e duração do estímulo, para obter um retrato o mais fiel possível das propriedades analgésicas de substâncias químicas (Tjolsen e cols., 1992). Os seguintes testes: contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, formalina e placa quente situam-se entre os mais comumente empregados com essa finalidade e por isso foram utilizados para determinar a atividade analgésica de FQ.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi originalmente descrito por Wander Wende e Margolin (1956) para ratos e modificado por Koster e cols., (1959) para camundongos. O ácido acético provoca reação dolorosa, produzindo inflamação aguda na área peritoneal. Desse modo, não age por estimulação direta de receptores nociceptivos peritoneais, mas pela liberação de substâncias endógenas que excitam as terminações nervosas (Gyires e Torna, 1984).

Foi demonstrado considerável aumento dos níveis de prostaglandinas  $E_2$  e  $F_{2a}$  no fluido peritoneal, após a injeção de ácido acético e portanto, o pronunciado efeito analgésico de fármacos similares a aspirina sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético pode ser explicado pelo bloqueio da síntese de prostaglandinas e conseqüente inibição do desenvolvimento de hiperalgesia. A morfina também mostra-se eficaz contra as contorções induzidas por esse agente irritante (Deraedt e cols., 1980; Gyires e Torna, 1984). Além de prostaglandinas, a participação de outros componentes inflamatórios na contorção induzida pelo ácido acético é sugerida pelo fato de que esse agente produz aumento da permeabilidade de vasos sanguíneos peritoneais (Gyires e Torna, 1984). A fração quinona administrada por via intraperitoneal foi capaz de inibir de modo significativo e dose-dependente, as contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.

O teste de formalina foi introduzido por Dubuisson e Dennis (1977) para gatos e ratos e posteriormente adaptado por Hunskaar e cols., (1985) para camundongos. Esse teste permite avaliar como um animal responde a dor contínua e moderada causada por injúria tecidual. Devido a essa conexão com lesão tecidual, acredita-se que esse ensaio fornece um modelo de dor clínica mais válido do que aqueles com estímulo fásico térmico ou mecânico (Dubuisson e Dennis 1977).

Um importante aspecto do teste de formalina em roedores consiste no fato de que esses animais manifestam duas fases distintas de comportamento nociceptivo que parecem envolver estímulos diferentes. A primeira fase tem início imediatamente após a injeção de formalina, dura de 3 a 5 minutos e provavelmente resulta de direta estimulação química de nociceptores. Subseqüentemente, existe um período de 10 a 15 minutos durante o qual os animais exibem comportamento muito pouco sugestivo de nocicepção. A segunda fase começa 15 a 20 minutos após a injeção de formalina, dura de 20 a 40 minutos e parece depender de processo inflamatório periférico e alterações no processamento central. Fármacos antiinflamatórios não esteroidais, como por exemplo a indometacina inibem o comportamento nociceptivo durante a segunda fase, enquanto que a primeira não é afetada (Rosland e cols., 1990). Os analgésicos narcóticos são capazes de inibir ambas as fases (Hunskaar e Hole, 1987). Resultados

experimentais indicaram que a substância P e bradicinina participam na fase inicial enquanto que a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina estão envolvidas na fase tardia (Shibata e cols., 1989). De modo significativo e dose-dependente, a fração quinona reduziu o comportamento nociceptivo dos animais, apenas na fase tardia do teste formalina, o que evidencia um efeito relacionado com a inibição da reação inflamatória. A naloxona, um conhecido antagonista opióide, não exerceu influência sobre o efeito antinociceptivo de FQ, mas aboliu o da morfina, indicando que a atividade antinociceptiva de FQ parece não envolver a atividade de receptores opióides.

O teste da placa quente desenvolvido há mais de 50 anos atrás por Woolfe e Mac-Donald (1944), consiste na aplicação de um estímulo de curta duração e alta intensidade que é detectado por terminações nervosas livres e transmitido através de vias neuronias de condução. Esse ensaio envolve funções cerebrais superiores e consiste em uma resposta ao estímulo nociceptivo que é organizada ao nível supra-espinhal (Gardmark e cols., 1998). Analgésicos fracos, tais como o ácido acetilsalicílico e paracetamol praticamente não exercem influência sobre a resposta no teste da placa quente (Tjolsen e cols., 1992). Esse teste tem sido largamente utilizado para medir a potência de opióides (Gong e cols., 1991; Plone e cols., 1996).

Enquanto a morfina (controle positivo) produziu efeito analgésico durante todo o período de duração do teste da placa quente, a fração quinona contrariamente não causou alteração significativa na resposta dos animais, indicando que provavelmente sua ação antinociceptiva não se manifesta ao nível do sistema nervoso central.

***CONCLUSÕES***

---

## 7 CONCLUSÕES

Os estudos realizados com a fração quinona (FQ) obtida de *A. oncocalyx*, nos permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

⇒ O método utilizado para a obtenção de oncocalyxona A a partir do extrato metanólico do cerne (caule) de *A. oncocalyx* mostrou-se eficiente, apresentando um rendimento de aproximadamente 80 %.

⇒ FQ inibiu de modo significativo e concentração-dependente, a agregação de plaquetas humanas induzida pelos seguintes agonistas: ADP, trombina, colágeno, ácido araquidônico e adrenalina em PRP, *in vitro*. Isso indica que essa fração provavelmente atua numa etapa do processo de ativação plaquetária que é comum a esses agentes agregantes. A inibição produzida por FQ foi reversível.

⇒ Considerando que FQ potencializou a atividade inibitória tanto da aspirina como da pentoxifilina sobre a agregação plaquetária, seu mecanismo de ação parece envolver principalmente a inibição de ciclooxigenase e em menor grau de fosfodiesterase de AMPc. Como FQ não alterou a resposta de plaquetas à L-arginina, sua ação provavelmente não é exercida via ativação de guanilil ciclase e aumento dos níveis citoplasmáticos de GMPc.

⇒ FQ também causou inibição da agregação de plaquetas de rato induzida tanto por ADP como por trombina *in vitro*. As plaquetas de rato quando comparadas às humanas mostraram-se menos susceptíveis a esses agentes agregantes, bem como à ação de FQ. Com base nos protocolos utilizados para os estudos *ex vivo*, não foi observada a atividade inibitória de FQ sobre a agregação de plaquetas de ratos induzida por ADP em PRP.

⇒ FQ inibiu a lipoperoxidação em homogeneizado de cérebro de rato *in vitro*. Os valores de  $Q_{1/2}$  obtidos através da determinação de TBARS e QL foram muito próximos e indicam potente propriedade antioxidante dessa fração.

⇒ No modelo de hepatotoxicidade induzida pelo  $CCl_4$  em ratos, FQ exerceu fraca ação protetora, determinada com base na medida da função hepática (ALT e AST), dos níveis de lipoperoxidação (TBARS) no tecido hepático e observação histopatológica.

⇒ Contudo FQ manifestou ação hepatoprotetora mais intensa no modelo de prolongamento pelo  $CCl_4$  do tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.

⇒ Adicionalmente, FQ inibiu de modo significativo e dose-dependente o edema de pata e a nocicepção em diversos modelos experimentais, utilizando ratos e camundongos respectivamente.

⇒ Os resultados obtidos sugerem que FQ apresenta atividades antiagregante plaquetária, antioxidante e antiedematogênica entre outras.



*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

---

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, A. M.; MATSUMO, K.; WATANABE, H. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 400, n. 1, p. 89-97, 2000.

AFANA'EV, I. B.; OSTRACHOVICH, E. A.; KORKINA, L. G. Effect of rutin and its copper complex on superoxide formation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. **FEBS Lett.**, v. 425, n. 2, p. 256-258, 1998.

AGRADI, E.; PETRONI, A.; SOCINI, A.; GALLI, C. In vitro effects of synthetic antioxidants and vitamin E arachidonic acid metabolism and thromboxane formation in human platelets and on platelet aggregation. **Prostaglandins**, v. 22, p. 255-266, 1981.

ALBERTINI, R.; ABUJA, P. M. Monitoring of low density lipoprotein oxidation by low-level chemiluminescence. **Free Radic. Res.**, v. 29, n. 1, p. 75-83, 1998.

ALBERTINI, R.; DE LUCA, G.; PALLADINI, G.; PASSI, A., MELZI D'ERIL, G. V.; ABUJA, P. M. Mechanistic aspects of the relationship between low-level chemiluminescence and lipid peroxidation of low-density lipoprotein. **FEBS Lett.**, v. 459, n. 1, p. 47-50, 1999.

ANFOSSI, G.; MASSUCO, P.; MULARONI, E.; CAVALOT, F.; MATTIELO, L.; TROVATI, M. Organic nitrates and compounds that increase intraplatelet cyclic guanosine monophosphate (cGMP) levels enhance the antiaggregating effects of the stable prostacyclin analogue Iloprost. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v. 49, p. 839-845, 1993.

ANFOSSI, G.; RUSSO, I.; MASSUCO, P.; MATTIELO, L.; PERNA, P.; TASSONE, F.; TROVATI, M. L-arginine modulates aggregation and intracellular cyclic 3,5-guanosine monophosphate levels in human platelets: direct effect and interplay with antioxidative thiol agent. **Thromb. Res.**, v. 94, n. 5, p. 307-316, 1999.

ANKE, T.; FABIAN, K. **Inhibitors of platelet aggregation**. Kaiserslautern, 1999. Disponível em: [http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Anke/home\\_pla.htm](http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Anke/home_pla.htm). Acesso em 20 de junho de 2000.

BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. (Ed.). **Human medicinal agents from plants**. Washington: American Chemical Society, 1993. (ACS Symposium Series, 534).

BANGA, H. S.; WALKER, R. K.; WINBERRY, L. K. Platelet adenylate cyclase and phospholipase C are affected differentially by ADP ribosylation. **Biochem. J.**, v. 252, p. 297-300, 1988.

BARRIE, A.; DANIEL, J. L.; SMITH, B. Mechanisms of platelet activation and inhibition. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 4, n. 1, p. 1-26, 1990.

BARROS, S. B. M.; TEIXEIRA, D. S.; AZNAR, A. E.; MOREIRA JR, J. A.; ISHII, I.; FREITAS, P. C. D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L.Miq. (Pariparoba). **Free Radic. Res. Latin Am.**, v. 48, n. 1/2, p. 114-116, 1996.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, P. A.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A Apparent hydroxyl radical production by peroxy nitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BELISARIO, M. A.; MATURO, M.; PECCE, R.; DE ROSA, S.; VILLANI, G. R. Effect of avarol and avarone on in vitro-induced microsomal lipid peroxidation. **Toxicology**, v. 72, n. 2, p. 221-233, 1992.

BELISARIO, M. A.; MATURO, M.; AVAGNALE, G.; DE ROSA, S.; SCOPACASA, F.; DE CATERINA, M. *In vitro* effect of avarone and avarol, a quinone/hydroquinone couple of marine origin, on platelet aggregation. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 79, n. 6, p. 300-304, 1996.

BERETZ, A.; CAZENAVE, J. P. Old and new natural products as the source of modern antithrombotic drugs. **Planta Med.**, v. 57, p. S68-S72, 1991.

BERLIN, I.; CRESPO-LAUMONNIER, B.; COURNOT, A.; LANDAULT, C.; AUBIN, F.; LEGRAND, J. C.; PUECH, A. J. The alfa<sub>2</sub>-adrenergic receptor antagonist yohimbine inhibits epinephrine-induced platelet aggregation in healthy subjects. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 49, n. 4, p. 362-369, 1991.

BESSON, J. M. The complexity of physiopharmacology aspects of pain. **Drugs**, v. 53, Suppl. 2, p. 1-9, 1997.

BEVILACQUA, M. P.; NELSON, R. N.; MANNORE, G.; CECCONI, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BOARDER, M. R.; WEISMAN, G. A.; TURNER, J. T.; WILKINSON, G. F. G protein-coupled P<sub>2</sub> purinoceptors: from molecular biology to functional responses. **Review**, v. 16, p. 133-139, 1995.

BODE-BOGER, S. M.; BOGER, R. H.; CREUTZIG, A.; TSIKAS, D.; GUTZKI, F. M. L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. **Clin. Sci.**, v. 87, p. 303-310, 1994.

BODZENTA-LUKASZYKE, A.; GABRYELEWICZ, A.; LUKASZYK, M.; BIELAWIEC, J. W.; KONTUREK, J. W.; DOMSCHKE, W. Nitric oxide synthase inhibition and platelet function. **Thromb. Res.**, v. 75, p. 667-672, 1994.

BORN, G. V. R.; CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **J. Physiol.**, v. 168, p. 178-195, 1963.

BOSTWICK, J. S.; KASIEWSKI, C. J.; CHU, V.; KLEIN, S. I.; SABATINO, R. D.; PERRONE, M. H.; DUNWIDDIE, C. T.; COOK, J. J.; LEADLEY JR, R. J. Anti-thrombotic activity of RG13965, a novel platelet fibrinogen receptor antagonist. **Thromb. Res.**, v. 82, n. 6, p. 495-507, 1996.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; DEAKIN, R. L.; FOLLENFANI, R. L.; WHITTLE, B. J. R.; GARLAND, L. G. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive Arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 110, p. 896-902, 1993.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró: Editora Universitaria da UFRN, 1976. 540 p. (Coleção Mossoroense, 3).

BRASS, L. F.; LASPOSATA, M.; BANGA, H. S. Regulation of the phosphoinositide hydrolysis pathway in thrombin - stimulated platelets by a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 16838-16847, 1986.

BRASS, L. F.; HOXIE, J. A.; KIEBER-EMMONS, T.; MANNING, D. R.; PONCZ, M.; WOOLKALIS, M. Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 344, p. 17-36, 1993.

BRECHER, G.; CRONKITE, E. P. Morphology and enumeration of human blood platelets. **J. Appl. Physiol.**, v. 3, p. 365-372, 1950.

BROEKMAN, M. J.; EIROA, A. M.; MARCUS, A. J. Inhibition of human platelet reactivity by endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vein endothelial cells in suspension: blockade of aggregation and secretion by an aspirin - insensitive mechanism. **Blood**, v. 78, p. 1033-1040, 1991.

BRÜNE, B.; VON APPEN, F.; ULLRICH, V. Oxidative stress in platelets. In: SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press, 1991. p. 421-443.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-188, 2000.

CASTRO, J. A.; DE FERREYRA, G. C.; DE CASTRO, C. R.; SESAME, H.; DE FENOS, O. M.; GILLETTE, J. R. Prevention of carbon tetrachloride - induced necrosis by inhibitors of drug metabolism. **Biochem. Pharmacol.**, v. 23, p. 295-305, 1974.

CATAPANO, A. L. Antioxidant effect of flavonoids. **Angiology**, v. 48, p. 39-44, 1997.

CHEN, L. Y.; MEHTA, J. L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 27, n. 1, p. 154-158, 1996.

CHINTALA, M. S.; CHIU, P. J.; BERNADINO, V.; TETZLOFF, G. G.; TEDESCO, R.; SABIN, C.; WATKINS, R. W.; SYBERTZ, E. J. Disparate effects of thrombin receptor activating peptide on platelets and peripheral vasculature in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 349, n. 2-3, p. 237-243, 1998.

CHIU, J. H.; HO, C. T.; WEI, Y. H.; LUI, W. Y.; HONG, C. Y. In vitro and in vivo protective effect of honokiol on rat liver from peroxidative injury. **Life Sci.**, v. 61, n. 19, p. 1961-1971, 1997.

CHUNG, M. I.; GAN, K. H.; LIN, C. N.; KO, F. N.; TENG, C. M. Antiplatelet effects and vasorelaxing action of some constituents of formosan plants. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 2, p. 313-316, 1994.

CLEMETSON, K. J. Platelet collagen receptors: a new target for inhibition. **Haemostasis**, v. 29, n. 1, p. 16-26, 1999.

CLEMETSON, J. M.; POLGAR, J.; MAGNENAT, E.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc $\alpha$ R and natural killer receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 41, p. 29019-29024, 1999.

COLAK, O.; SAHIN, A.; ALATAS, O.; INAL, M.; YASAR, B.; KIPER, H. The effect of ginkgo biloba on the activity of catalase and lipid peroxidation in experimental strangulation ileus. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 28, n. 1, p. 69-71, 1998.

COLLEN, D.; LU, H. R.; STASSEN, J. M.; YREYS, I.; YASUDA, T.; BUNTING, S.; GOLD, H. Antithrombotic effects and bleeding time prolongation with synthetic platelet GPIIb/IIIa inhibitors in models of platelet-mediated thrombosis. **Thromb. Haemostasis**, v. 71, p. 95-102, 1994.

COLMAN, R. W. Receptors that activate platelets. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 197, n. 3, p. 242-248, 1991.

COOK, N. S.; BRUTTGER, O.; PALLY, C.; HAGEN-BACH, A. The effects of two synthetic glycoprotein IIb/IIIa antagonists, Ro43-8857 and L-700,462, on platelet aggregation and bleeding in guinea-pigs and dogs: Evidence that Ro43-8857 is orally active. **Thromb. Haemostasis**, v. 70, p. 838-847, 1993a.

COOK, N. S.; ZERWES, H. G.; TAPPARELLI, C.; POWLING, M.; SINGH, J.; METTERNICH, R.; HAGENBACH, A. Platelet aggregation and fibrinogen binding in human, rhesus monkey, guinea-pig, hamster and rat blood: activation by ADP and thrombin receptor peptide and inhibition by glycoprotein IIb/IIIa. **Thromb. Haemostasis**, v. 70, p. 531-539, 1993b.

COUGHLIN, S. R. Molecular mechanisms of thrombin signaling. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 4, p. 270-277, 1994.

COUGHLIN, S. R. How the protease thrombin talks to cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, n. 20, p. 11023-11027, 1999.

COX, D.; MOTOYAMA, Y.; SEKY, J.; AOKI, I.; DOHI, M.; YOSHIDA, K. Pentamidine: A non-peptide GPIIb/IIIa antagonist-in vitro studies on platelets from humans and other species. **Thromb. Haemostasis**, v. 68, p. 731-736, 1992.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; GILAD, E.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. Protective effect of melatonin in carrageenan - induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. **J. Pineal Res.**, v. 23, n. 2, p. 106-116, 1997.

CUZZOCREA, S.; ZINGARELLI, B.; HAKE, P.; SALZMAN, A. L.; SZABO, C. Antiinflammatory effects of mercaptoethylguanidine, a combined inhibitor of nitric oxide synthase and peroxynitrite scavenger, in carrageenan - induced models of inflammation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 3, p. 450-459, 1998.

DAMAS, J.; REMACLE-VOLON, G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 211, p. 81-86, 1992.

DANIEL, J. L.; DANGELMAIER, C.; JIN, J.; KIM, Y. B.; KUNAPULI, S. P. Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation. **Thromb. Haemost.**, v. 82, n. 4, p. 1322-1326, 1999.

DAVINO, S. C.; BARROS, S.; BARROS, S. B. M. Antioxidant activity of *Iryanthera sagotiana* leaves **Fitoterapia**, v. 69, n. 2, p. 185-186, 1998.



DE GAETANO, G.; CAVENAGHI, E.; STELLA, L. Ditazole and platelets. II. Effect of ditazole on in vivo platelet aggregation and bleeding time in rats. **Haemostasis**, v. 6, p. 190-196, 1977.

DE GRAAF, J. C.; BANGA, J. D.; MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; DE GROOT, P. G.; SIXMA, J. J. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. **Circulation**, v. 85, p. 2284-2290, 1992.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Europ. J. Pharmacol.**, v. 61, p.17-24, 1980.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe pellata* (L) Miq. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 1, p. 85-91, 1997.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("macela"). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 9, p. 1163-1170, 1998.

DESMARCHELIER, C.; ROMANO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "Caatinga" region in northeastern Brazil. **J. Ethnopharmacol.** v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DEMIRYUREK, A. T.; CAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 82, n. 3, p. 113-117, 1998.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 23 n. 4, p. 297-298, 1971.

DONALD BROWN, N. D. Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. **Lancet**, v. 343, p. 1513-1515, 1994.

DORN, G. W. II Distinct platelet thromboxane  $A_2$ / prostaglandin  $H_2$  receptor subtypes. A radioligand binding study of human platelets. **J. Clin. Invest.**, v. 84, p. 1883-1891, 1989.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of the morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p.161-174, 1977.

EDDY, N. B., LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and Dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, n. 4/5, p. 221-357, 1998a.

EISERICH, J. P.; HRISTOYA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, n. 22, p. 393-397, 1998b.

FEE, J. A.; TEITELBAUM, D. Evidence that superoxide dismutase plays a role in protecting red blood cells against peroxidative hemolysis. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 49, p. 150-158, 1972.

FERRANDIZ, M. L.; BUSTOS, G.; PAYA, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M. J. Hispindulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. **Life Sci.**, v. 55, n. 8, p. 145-150, 1994.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO, J. N.; RAZ, B.; SEQUIN, U., Novel quinone methides from *Salacia kraussii* with in vitro antimalarial activity. **J. Nat. Prod.**, v. 61, n. 6, p. 718-723, 1998.

FITZGERALD, G. A. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A<sub>2</sub> as an amplifying signal for other agonists. **Am. J. Cardiol.**, v. 68, n. 7, p. 11B-15B, 1991.

FOLTS, J. D.; SCHAFFER, A. I.; LOSCALZO, J.; WILLERSON, J. T.; MULLER, J. E. A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: A comparison of studies in an animal model with clinical trials. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 33, p. 295-303, 1999.

FONG, J. S. C. Alfa-tocoferol: its inhibition on human platelet aggregation. **Experientia**, v. 32, p. 639-641, 1976.

FONTENELE, J. B.; SOUSA, D. C. Efeitos de *Hymenaea courbaril* linn., *Auxemma oncocalyx* taub., *Torresea cearensis*, fr. all. e *Jatropha gossypifolia* Linn. sobre a agregação plaquetária. In: ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 11., 1992, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza, 1992. p. 128.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoides. **Food Chem. Toxicol.**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.



FRAGA, V.; MENENDEZ, R.; AMOR, A. M.; GONZALEZ, R. M.; ZIMENEZ, S.; MAS, R. Effect of policosanol on in vitro and in vivo rat liver microsomal lipid peroxidation. **Arch. Med. Res.**, v. 28, n. 3, p. 355-360, 1997.

FREEDMAN, J. E.; FARHAT, J. H.; LOSCALZO, J.; KEANEY JR, J. F. Alfa-tocoferol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C - dependent mechanism. **Circulation**, v. 94, n. 10, p. 2434-2440, 1996.

FREEDMAN, J. E.; LOSCALZO, J.; BARNARD, M. R.; ALPERT, C.; KEANEY, J. F.; MICHELSON, A. D. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 2, p. 350-356, 1997.

FUHRMAN, B.; BUCH, S.; VAYA, J.; BELINKY, P. A.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; AVIRAM, M. Licorice extract and its major polyphenol glabridin protect low-density lipoprotein against lipid peroxidation: in vitro and in vivo studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E - deficient mice. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, n. 2, p. 267-275, 1997.

GACHET, C.; CATTANEO, M.; OHLMANN, P.; HECHLER, B.; LECCHI, A.; CHEVALIER, J.; CASSEL, D.; MANNUCCI, P. M.; CAZENAVE, J. P. Purinoceptors on blood platelets: further pharmacological and clinical evidence to suggest the presence of two ADP receptors. **Br. J. Haematol.**, v. 91, n. 2, p. 434-444, 1995.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newboudia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1315-1320, 1996.

GALLI, C.; SOCINI, A. Biological actions and possible uses of vitamin E. **Acta Vitaminol. Enzymol.**, v. 4, n. 3, p. 245-251, 1982.

GARDMARK, M., HÖGLUND, A. U., HAMMARLUND-UDENAES, M. Aspects on tail-flick, hot-plate and electrical stimulation tests for morphine antinociception. **Pharmacology & Toxicology**, v. 83, p. 252-258, 1998.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B. A.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. **Biomed. & Pharmacother.**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GIBBINS, J. M.; OKUMA, M.; FARNDALE, R.; BARNES, M.; WATSON, S. P. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma - chain. **FEBS Lett.**, v. 413, n. 2, p. 255-259, 1997.

GILANI, A. H.; JANBAZ, K. H.; SHAH, B. H. Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCl<sub>4</sub>. **Pharmacol. Res.**, v. 37, n. 1, p. 31 - 35, 1998.

GILLIS, J. C.; BENEFIELD, P.; MCTAVISH, D. Idebenone. A review of this pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in age - related cognitive disorders. **Drugs Aging**, v. 5, n. 2, p.133-152, 1994.

GIROTTI, A. W. Mechanisms of lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 1, p. 87-95, 1985.

GONG, Q., HEDNER, T., HEDNER, J., BJÖRKMAN, R., NORDBERG, G. Antinociceptive and ventilatory effects of the morphine metabolites: morphine-6-glucuronide and morphine-3-glucuronide. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 193, p. 47-53, 1991.

GOTOH, T.; SHIKAMA, K. Generation of the superoxide radical during the autoxidation of oxymyoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 80, p. 397-399, 1976.

GUH, J. H.; KO, F. N.; JONG, T. T.; TENG, C. M., Antiplatelet effect of gingerol isolated from *Zingiber officinale*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 97, p. 329-332, 1995.

GULAYA, N. M.; KUZMENKO, A. L.; MARGITICH, Y. M.; GOYSEEVA, N. M.; MELNICHUK, S. D.; GORIDKO, T. M.; ZHUKOV, A. D. Long-chain N-acylethanolamines inhibit lipid peroxidation in rat liver mitochondria under acute hypoxic hypoxia. **Chem. Phys. Lipids**, v. 97, n. 1, p. 49-54, 1998.

GUTTERIDGE, J. M. C. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxide. **FEBS Lett.**, v. 201, p. 291-295, 1986.

GYIRES, K.; TORNA, Z. The use of the writhing test in mice for screening different types of analgesics. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 267, p. 131-140, 1984.

HABIB, A.; FITZGERALD, G. A.; MACLOUF, J. Phosphorylation of the thromboxane receptor alpha, the predominant isoform expressed in human platelets. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 5, p. 2645-2651, 1999.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; HOULT, J. R.; BLACKIE, D. R. Oxidants, inflammation e anti-inflammatory drugs. **FASEB J.**, v. 2, p. 2867-2873, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extra cellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.

HANCOCK, J. T. Superoxide, hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules: their production and role in disease. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 54, n. 1, p. 38-46, 1997.

HERMAN, A. G. Rationale for the combination of anti-aggregating drugs. **Thromb. Res.**, v. 92, p. S17-S21, 1998.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; RABANAL, R. M.; DE LA TORRE, M. C.; RODRÍGUEZ, B. Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic and haematological effects of Aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopsis* roots and two hemisynthetic derivatives. **Planta Med.**, v. 61, p. 505-509, 1995.

HIRATA, M.; HAYASHI, Y.; USHIKUBI, F.; YOKOTA, Y.; KAGEYAMA, R.; NAKANISHI, S.; NARUMIYA, S.; USHIKUBI, F.; KAKIZUKA, A.; OKUMA, M.; NARUMIYA, S. Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A<sub>2</sub> receptor. **Nature**, v. 349, p. 617-620, 1991.

HJEMDAHL, P.; LARSSON, T.; WALLEN, N. H. Effects of stress and  $\beta$ -blockade on platelet function. **Circulation**, v. 84, suppl. 6, n. 6, p. VI-44-VI-58, 1991.

HOUGHTON, P. I.; ZARKA, R.; DE LAS HERAS, B.; HOULT, J. R. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. **Planta Med.**, v. 61, n. 1, p. 33-36, 1995.

HUNG, D. T.; WONG, Y. H.; VU, T. K.; COUGHLIN, S. R. The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate both phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. **J. Biol. Chem.**, v. 353, p. 20831-20834, 1992.

HUONG, N. T. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 9, p. 978-981, 1998.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S.; DI ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 211, n. 2, p. 177-182, 1992.

INASU, T.; TANIGUCHI, T.; YANAGI, S.; YAMAMUCI, H. Protein tyrosine phosphorylation and aggregation of intact human platelets by vanadate with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 170, p. 250-263, 1990.

INOUE, K.; OZAKI, Y.; SATOH, K.; WU, Y.; YATOMI, Y.; SHIN, Y.; MORITA, T. Signal transduction pathways mediated by glycoprotein Ia/IIa in human platelets: comparison with those of glycoprotein VI. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 256, n. 1, p. 114-120, 1999.

ISMAIL, T. S.; GOPALAKRISHNAN, S.; BEGUM, V. H.; ELANGO, V. Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetraacantha* Lam. *J. Ethnopharmacol.*, v. 56, n. 2, p. 145-152, 1997.

ITOIGAWA, M.; KASHIWADA, Y.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; TACHIBANA, Y.; BASTOW, K. F.; LEE, K. H. Antitumor agents. 203. Carbazole alkaloid murreyaquinone A and related synthetic carbazolequinones as cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 893-897, 2000.

JAKOBY, W. B.; ZIEGLER, D. M. The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.*, v. 265, n. 34, p. 20715-20718, 1990.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid- reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 9, p. 515-540, 1990.

JANTZEN, H. M.; GOUSSET, L.; BHASKAR, V.; VINCENT, D.; TAI, A.; REYNOLDS, E. E.; CONLEY, P. B. Evidence for two distinct G- protein - coupled ADP receptors mediating platelet activation. *Thromb. Haemost.*, v. 81, n. 1, p. 111-117, 1999.

JAVATILAKA, K. A. P. W.; THABREW, M. I.; PERERA, D. J. B. Effects of *Mader aspatana* on carbon tetrachloride - induced changes in rat hepatic microsomal drug - metabolizing enzyme activity. *J. Ethnopharmacol.*, v. 30, p. 97-105, 1990.

JIN, J.; DANIEL, J. L.; KUNAPULI, S. P. Molecular basis for ADP - induced platelet activation. II. The P<sub>2Y1</sub> receptor mediates ADP - induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.*, v. 273, n. 4, p. 2030 - 2034, 1998.

JOYEUX, M.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; MORTIER, F. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from Ginkgo and some flavonoids. **Planta Med.**, v. 61, n. 2, p. 126 - 129, 1995.

JUNGLER, H., SORKIN, L. S. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF- $\alpha$ . **Pain**, v. 85, p. 145-151, 2000.

KAGAN, V. E.; SERBINOVA, E. A.; KOYNOVA, G. M.; KITANOVA, S. A.; TYURIN, V. A.; STOYTCHEV, T. S.; QUINN, P. J.; PACKER, L. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 9, n. 2, p. 117-126, 1990.

KAUR, H.; HALLIWELL, B. Action of biologically- relevant oxidizing species upon uric acid: identification of uric acid oxidation products. **Chem. Biol. Interact.**, v. 73, p. 235-247, 1990.

KAWAGOE, M.; NAKAGAWA, K. Attenuation of luminol - amplified chemiluminescence intensity and lipid peroxidation in the livers of quercetin - fed mice. **Toxicol. Lett.** v. 114, n. 1-3, p. 189-196, 2000.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KO, F. N.; LEE Y. S.; KUO, S. C.; CHANG, Y. S.; TENG, C M. Inhibition on platelet activation by shikonin derivatives isolated from *Arnebia euchrona*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1268, p. 329-334, 1995.

KO, F. N.; WU, T. S.; LU, S. T.; WU, Y. C.; HUANG, T. F.; TENG, C. M. Antiplatelet effects of protopine isolated from *Corydalis tubers*. **Thromb. Res.**, v. 56, p. 289-298, 1989.

KO, F. N.; LEE, Y. S.; WU, T. S.; TENG, C. M. Inhibition of cyclooxygenase activity and increase in platelet cyclic AMP by girinimbine, isolated from *Murraya euchrestifolia*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 48, n. 2, p. 353-360, 1994.

KOBILKA, B. K.; MATSUI, H.; KOBILKA, T. S. Cloning, sequencing and expression of the gene coding for the human platelet  $\alpha_2$ -adrenergic receptor. **Science Wash. DC**, v. 238, p. 650-656, 1987.

KONISHY, H.; TANAKA, M.; TAKEMURA, Y.; MATSUZAKI, H.; ONO, Y.; KIKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, p. 11233-11237, 1997.



KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p.412-417, 1959.

KROLL, M. H.; SCHAFER, A. I. Biochemical mechanisms of platelet activation. **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 74, n. 4, p. 1181-1195, 1989.

KUEHL, F. A., EGAN, R. W., Prostaglandins arachidonic acid and inflammation. **Science**, v. 210, p. 978-984, 1980.

KUMAR, K. C. S.; MULLER, K. Medicinal plants from Nepal; II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 64, n. 2, p. 135-139, 1999.

KUO, S. C.; CHEN, S. C.; CHEN, L. H.; WU, J. B.; WANG, J. P.; TENG, C. M. Potent antiplatelet, anti-inflammatory and antiallergic isoflavanquinones from the roots of *Abrus precatorious*. **Planta Med.**, v. 61, n. 4, p. 307-312, 1995.

LANDI, L.; CABRINI, L.; FIORENTINI, D.; STEFANELLI, G.; PEDULLI, G. F. The antioxidant activity of ubiquinol-3 in homogeneous solution and in liposomes. **Chem. Phys. Lipids**, v. 61, n. 2, p. 121-130, 1992.

LANG, E., NOVAK, A., REEH, P. W., HANDWERKER, H. O. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. **J. Neurophysiol.**, v. 63, p. 887-901, 1990.

LEFKOVITS, J.; PLOW, E. F.; TOPOL, E. J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. **N. Engl. J. Med.**, v. 1553-1559, 1995.

LEYVA, A.; PESSOA, C.; BOOGAERDT, F.; SOKAROSKI, R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L. A.; HURUTA, MORAES, M. O. Oncocalyxones A and C, 1,4-anthracenediones from *Auxemma oncocalyx*: comparison with anticancer 1,9-antracendiones. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 2A, p. 1029-1031, 2000.

LIMA, D. A. **Plantas das caatingas**. Rio de Janeiro:Academia Brasileira de Ciências, 1989.

LIN, C. C.; SHIEH, D. E.; YEN, M. H. Hepatoprotective effect on the fractions of Ban- zhi- liam on experimental liver injuries in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 56, p. 193-200, 1997.

LIN, C. C.; HSU, F.; LIN, T. C.; HSU, F. L.; HSU, H. Y. Antioxidant and hepatoprotective activity of Punicalagin and Punicalin on carbon tetrachloride - induced liver damage in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 789-794, 1998.

LINO, C. S.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. C.; VIANA, G. S. B. Estudo da atividade analgésica e antiedematogênica do extrato hidroalcoólico de *Auxemma*

*oncocalyx* e *oncocalyxona* A. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis, 1996. p 95.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The role of  $O_2^-$  in the production of  $OH^\cdot$  in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 29-33, 1994.

LISSI, E. A.; CÁCERES, T.; VIDELA, L. A. Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 2, p. 63-69, 1986.

LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evolving dose-effect experiment. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-113, 1949.

MACKAY, A. R.; SEDGWICK, A. D.; DUNN, C. J.; FLEMMING, W. E.; WYLOUGHBI, D. A. The transition from acute to chronic inflammation. **Br. J. Dermatol.**, v. 113, p. 34-48, 1985.

MAFFRAND, J. P.; BERNAT, A.; DELEBASSEE, D.; DEFREYN, G.; CAVENAVE, J. P.; GORDON, J. L. ADP plays a key role in thrombogenesis in rats. **Thromb. Haemost.**, v. 59, p. 225-230, 1988.

MAITRA, I.; MARCOCCI, L.; DROY-LEFAIX, M. T.; PARCKER, L. Peroxyl radical scavenging activity of Ginkgo biloba extract EGb 761. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, n. 11, p. 1649-1655, 1995.

MANNA, C.; GALLETI, P.; CUCCIOLLA, V.; MOLTEDO, O.; LEONE, A.; ZAPPIA, V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4- dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. **J. Nutr.**, v. 127, n. 2, p. 286-292, 1997.

MANRIQUE, R. V.; MANRIQUE, V. Platelet resistance to prostacyclin. Enhancement of the antiaggregatory effect of prostacyclin by pentoxifylline. **Angiology**, v. 38, n. 2Pt1, p.101-108, 1987.

MARCUS, A. J. The role of lipids in platelet function: with particular reference to the arachidonic acid pathway. **J. Lipid Res.**, v. 19, p. 793 - 826, 1978.

MARIETTA, M.; FACCHINETTI, F.; NERI, I. PICCININI, F. L-arginine infusion decreases platelet aggregation through an intraplatelet nitric oxide release. **Thromb. Res.**, v. 88, p. 229-235, 1997.

MASSO, J. M.; CONDE, J. R.; VILLAR, A. M.; MARTORELL, J. Effect of fepradinol on rat hind paw oedema induced by several inflammatory agents. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 45, n. 11, p. 959-962, 1993.

MATOS, F. J. A. Aproveitamento de plantas medicinais da região nordeste. **Rev. Bras. Farm.**, v. 63, n. 3, p. 132-140, 1982.

MCNICOL, A.; SHIBOU, T. S. Translocation and phosphorylation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in activated platelets. **Thromb. Res.**, v. 92, n. 1, p. 19-26, 1998.

MERATI, G.; PASQUALI, P.; VERGANI, C.; LANDI, L. Antioxidant activity of ubiquinone-3 in human low density lipoprotein. **Free Radic. Res. Commun.**, v. 16, n. 1, p. 11-17, 1992.

MERINO, N.; GONZALEZ, R.; GONZALEZ, A.; REMIREZ, D. Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl<sub>4</sub> in rats. **Archives of Medical Research**, v. 27, n. 3, p. 285-289, 1996.

MEHTA, J. L.; CHEN, L. Y.; KONE, B. C.; MEHTA, P., TURNER, P. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide syntase in human platelets. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, n. 3, p. 370-377, 1995.

MICHELSON, A. D.; BENOIT, S. E.; FURMAN, M. I.; BRECKWOLDT, W. L.; ROHRER, M. J.; BARNARD, M. R.; LOSCALZO, J. Effects of endothelium - derived relaxing factor/nitric oxide on platelet surface glycoproteins. **Am. J. Physiol.**, v. 270, H1640-H1648, 1996.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 1, p. 188-192, 1972a.

\_\_\_\_\_. The role of anion superoxide in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972b.

MITCHEVA, M.; ASTROUG, H.; DRENSKA, D.; POPOV, A.; KASSAROVA, M. Biochemical and morphological studies on the effects of anthocyanins and vitamin E on carbon tetrachloride induced liver injury. **Cell. Mol. Biol.**, v. 39, n. 4, p. 443-448, 1993.

MONCADA, S., HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.**, v. 21, p. 361-374, 1991.

MONTILLA, M. P.; CABO, J.; NAVARRO, M. C.; RISCO, S.; JIMENEZ, R. S.; ANEIROS, J. The protective and curative action of *Withania frutescens* leaf extract against CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. **Phytother. Res.**, v. 4, p. 212-215, 1990.

MORDENTE, A.; MARTORANA, G. E.; MINOTTI, G.; GIARDINA, B. Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5methyl-6-(10-hydroxy-decyl)-1-4-benzoquinone (idebenone). **Chem. Res. Toxicol.**, v. 11, n. 1, p. 54-63, 1998.



MORELLO, A.; PAVANI, M.; GARBARINO, J. A.; CHAMY, M. C.; FREY, C.; MANCILLA, J., Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on cells tumoral and trypanosoma parasites. **Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 112, n. 2, p. 119-128, 1995.

MORI, K.; USHIO, T.; OKAMOTO, T.; KISHI, T.; SAYO, H. Effect of arylthiolated 2,3-dimethoxy-1,4-benzoquinones on respiratory activity and lipid peroxidation in bovine heart mitochondria. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 3, p. 293-296, 1998.

MOROI, M.; JUNG, S. M.; OKUMA, M.; SHINMYOZU, K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen - induced aggregation and adhesion. **J. Clin. Invest.**, v. 84, n. 5, p. 1440-1445, 1989.

MORRIS, C. J.; EARL, J. R.; TRENAM, C. W.; BLAKE, D. R. Reactive oxygen species and iron-a dangerous partnership in inflammation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 27, p. 109-122, 1995.

MOURELLE, M.; MURIEL, P.; FAVARI, L.; FRANCO, T. Prevention of CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis by silymarin. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 3, p. 183-191, 1989.

MUKAI, K.; MORIMOTO, H.; KIKUCHI, S.; NAGAOKA, S. Kinetic study of free radical - scavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocopherol quinone) in solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1157, n. 3, p. 313-317, 1993.

MULLER, D. P.; GROSS-SAMPSON, M. A. Neurochemical, neurophysiological and neuropathological studies in vitamin E deficiency. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 5, p. 239-247, 1990.

MURAGANDAM, A.; MUTUS, B. Isolation of nitric synthase from human platelets. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1200, p. 1-6, 1994.

MURAKAMI, T.; NAGAMURA, Y.; HIRANO, K. The effect of ethanolamine on acute carbon tetrachloride intoxication. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, n. 1, p. 84-86, 1998.

MUSTARD, J. F.; PERRY, D. W.; ARDLIE, N. G.; PACKHAM, M. A. Preparations of suspensions of washed platelets from humans. **Brit. J. Haematol.**, v. 22, p. 193-207, 1972.

MUSTARD, J. F.; KINLOUGH-RATHBONE, R. L.; PACKHAM, M. A. Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing. **Methods Enzymol.**, v. 169, p. 3-11, 1989.

NAIR, V.; TURNER, G. A. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: structure of the adduct with malondialdehyde. **Lipids**, v. 19 p. 804 - 805, 1984.

NARJES, H.; MÜLLER, T. H.; WEISENBERGER, H.; GUTH, B.; BRICKL, R. Inhibition of platelet aggregation as a surrogate marker. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 37, p. 59S-64S, 1997.

NENCI, G. G.; GRESELE, P.; AGNELLI, G.; BALLATORI, E. Effect of pentoxifylline on platelet aggregation. **Pharmatherapeutica**, v. 2, n. 8, p.532-538, 1981.

NEUZIL, J.; WITTING, P. K.; STOCKER, R. Alpha-tocopheryl hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, n. 15, p. 7885-7890, 1997.

ODUKOYA, O. A.; HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. Lipoxigenase inhibitors in the seeds of *Aframomun danelli* K. Schum. (Zingiberaceae). **Phytomedicine**, v. 6, n. 4, p. 251-256, 1999.

OKWU, A. K.; MAIS, D. E.; HALUSHKA, P. V. Agonist-induced phosphorylation of human platelet TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> receptors. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1221, n. 1, p. 83-88, 1994.

PACKHAN, M. A.; MUSTARD, J. F. Pharmacology of platelet-affecting drugs. **Circulation**, v. 62, suppl. 5, p. V26-V41, 1980.

PALMER, R. M. J.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 333, p. 664-666, 1988.

PALUMBO, E. J.; STWEATT, J. D.; CHEN, S. J.; KLANN, E. Oxidation-induced persistent activation of protein kinase C in hippocampal homogenate. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 187, p. 1439-1445, 1992.

PARRATT, J. R.; WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind - paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine dextran, eggwhite and coumpound 48/80. **Br. J. Pharmacol.**, v. 13, p. 65-70, 1958.

PAYAN, D. G., KATZUNG, B. G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; monopiod analgesics; drugs used in gout. In: KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 6. ed. Connecticut: Appleton & Lange, 1046 p., cap. 35, p. 536-559.

PEREZ-ALVAREZ, V.; BOBADILLA-LUGO, R. A.; MURIEL, P.; FAVARI, L.; VILLANUEVA-LOPEZ C. Effects of leukotriene synthesis inhibition on acute liver damage induced by CCl<sub>4</sub>. **Pharmacology**, v. 47, p. 330-336, 1993.

PERRY, N. B.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G. A citotoxic and antifungal 1,4-naphthoquinone and related compounds from a New Zealand brown alga, *Landsburgia quercifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, n. 4, p. 978-985, 1991.

PESSOA, C.; MENDES, C. S.; PESSOA, L. O.; SABINO, S. H.; LEMOS, T. L.; MORAES, M. O. Avaliação da atividade antitumoral de *Auxemma oncocalyx* Taub. (Pau Branco) (Resumo). VII REUNIÃO DA FESBE, 7., 1992, Caxambu. **Resumos do...** Caxambu, 1992. p.168.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E. R.; LEMOS, T. L.; WETMORE, L.A.; MORAES, M. O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytother. Res.**, v. 14, n. 13, p. 187-191, 2000.

PESSOA, O. D. L. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do nordeste: *Auxemma oncocalyx* Taub.** 1994. Tese (Doutorado) - Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1994.

PESSOA, O. D. L.; DE LEMOS, T. L. G. Allantoin and fatty acid composition in *Auxemma oncocalyx*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 78, n. 1, p. 9-10, 1997.

PESSOA, O. D. L.; DE LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Novel cordiachromes isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 2 n. 2, p. 145-150, 1993.

PESSOA, O. D. L.; DE LEMOS, T. L. G.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Cordiachromes from *Auxemma oncocalyx*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 6, p. 1777 - 1786, 1995.

PIERGIACOMI, V. A.; PALACIOS, A.; CATALA, A. Vitamin A inhibits lipoperoxidation ascorbate-Fe<sup>++</sup> dependent of rat kidney microsomes and mitochondria. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 165, n. 2, p. 121-125, 1996.

PIETRANGELO, A.; BORELLA, F.; CASALGRANDI, G.; MONTOSI, G.; CECCARELLI, D.; GALLESSE, D.; GIOVANNINI, F. Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. **Gastroenterology**, v. 109, n. 6, p. 1941-1946, 1995.

PLATT, W. R. Trombocitos, hemostasia y coagulación sanguínea. In: MILLÁN, L. M. **Atlas de hematología en color**. Barcelona: Editorial JIMS, 1972. p. 187.

PLONE, M. A., EMERICH, D, F., LINDNER, M. D. Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. **Pain**, v. 66, p. 265-270, 1996.

PRASAD, K.; LAXDAL, V. A.; YU, M.; RANEY, B. L. Antioxidant activity of allicin, an active principle in garlic. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 148, n. 2, p. 183-189, 1995.

PRASAD, K.; LAXDAL, V. A.; YU, M.; RANEY, B. L. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging property of garlic. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 154, n. 1, p. 55-63, 1996

PRÁTICO, D.; PASIN, M.; BARRY, O. P.; GHISELLI, A.; SABATINO, G.; IULIANO, L.; FITZGERALD, G. A.; VIOLI, F. Iron-dependent human platelet activation and hidroxyl radical formation: involvement of protein kinase C. **Circulation**, v. 99, n. 24, p. 3118-3124, 1999.

PRINCIPE, D. D.; MATTEIS, W. D.; CORPO, M. L. D.; GIULIO, S. D.; FINAZZIAGRO, A. Hydrogen peroxide has a role in the aggregation of human platelets. **FEBS Lett.**, v. 185, p. 142-146, 1985.

PURI, R. N.; COLMAN, R. W. ADP-induced platelet activation. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 6, p. 437-502, 1997.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 5193-5197, 1990a.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Characterization of the L-arginine: nitric oxide pathway in human platelets. **Br. J. Pharmacol.**, v. 101, p. 325-328, 1990b.

RAMOS, C. L.; POU, S.; ROSEN, G. M. Effect of anti-inflammatory drugs on myeloperoxidase-dependent hidroxil radical generation by human neutrophils. **Biochem. Pharmacol.** v. 49, n. 8, p. 1079-1084, 1995.

RIBEIRO, R. A.; FLORES C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA S. H. et al. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RONALD, M. B.; CHRISTOPHER, D. H. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Arch. Pharmacol.**, v. 342, p. 189-193, 1990.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice-effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

ROSSIGNOL, L.; PLANTAVID, M.; CHAP, H.; DOUSTE-BLAZY, L. Effects of two methyl-xanthines, pentoxifylline and propentofylline, on arachidonic acid

metabolism in platelets stimulated by thrombin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 37, n. 17, p. 3229-3236, 1988.

ROT, A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. **Immunol. Today**, v. 13, n. 8, p. 291-294, 1992.

RUBBO, H.; RADJ, M.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 26066-26075, 1994.

RUEFF, A., DRAY, A. Pharmacological characterization of the effects of 5-hydroxytryptamine and different prostaglandins on peripheral sensory neurons in vitro. **Agents Actions**, v. 38, p. C13-C15, 1993.

RUGGERI, Z. M. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. **Semin. Hematol.**, v. 31, n. 3, p. 229-239, 1994.

SADZUKA, Y.; SUGIYAMA, T.; SHIMOI, K.; KINAE, N., HIROTA, S. Protective effect of flavonoides on doxorubicin- induced cardiotoxicity. **Toxicol. Lett.**, v. 92, n. 1, p. 1-7, 1997.

SALVEMINI, D.; BOTTING, R. Modulation of platelet function by free radicals and free - radical scavengers. **TIPS**, v.14, p. 36 - 42, 1993.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996a.

SALVEMINI, D.; MISCO, T. P.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J. L.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 7240-7244, 1993.

SALVEMINI, D.; SETTLE, S. L.; MASFERRER, J. L.; SEIBET, K.; CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 1171-1178, 1995.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan - induced rat paw edema. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 303, n. 3, p. 217-220, 1996b.

SAMOKYSZYN, V. M.; THOMAS, C. E.; REIF, D. W.; SAITO, M.; AUST, S. D. Release of iron from ferritin and its role on oxygen radicals toxicities. **Dug Metab. Rev.**, v. 19, p. 283-303, 1988.

SASE, K.; MICHEL, T. Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase in human blood platelets. **Life Sci.**, v. 57, p. 2049-2055, 1995.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, 323-328, 1995.

SAUVAIN, M.; DEDET, J. P.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTER, J. C.; GAYRAL, P.; KUNESCH, G. In vitro and in vivo leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoides. **Phytotherapy Res.**, v. 7, p. 167-171, 1993.

SAWICKI, G.; SALAS, E.; MURAT, J.; MISZTA-LANE, H.; RADOMSKI, M. W.; Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation. **Nature**, v. 386, p. 616-619, 1997.

SCHAIBLE, H. G., SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E<sub>2</sub>. **J. Physiol.**, v. 403, p. 91-104, 1988.

SCHROR, K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. **Semin. Thromb. Hemost.**, v. 23, n. 4, p. 349-356, 1997.

SCHULZ, R.; TRIGGLE, C. R. Role of NO in vascular smooth muscle and cardiac muscle function. **Reviews**, v. 15, p. 255-259, 1994

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: proeminent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEKIYA, F.; KAWAJIRI, K.; TAKAGI, J.; SAITO, Y.; NAGASE, S. Albumin in plasma potentiates platelet aggregation induced by collagen. A study with an albumin deficient rat. **Thromb. Res.**, v. 58, p. 657-662, 1990.

SHEU, J. R.; LEE, C. R.; LIN, C. C.; KAN, Y. C.; LIN, C. H.; HUNG, W. C.; LEE, Y. M.; YEN, M. H. The antiplatelet activity of PMC, a potent alpha-tocopherol analogue, is mediated through inhibition of cyclo-oxygenase. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 5, p. 1206-1212, 1999.

SHI, H.; NIKI, E. Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants. **Lipids**, v. 33, n. 4, p. 365-370, 1998.

SHI, H.; NOGUCHI, N.; NIKI, E. Comparative study on dynamics of antioxidative action of alpha-tocopheryl hydroquinone, ubiquinol, and alpha-tocopherol against lipid peroxidation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 3-4, p. 334-346, 1999.



SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-35, 1989.

SIEBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; IAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SIEGEL, D.; BOLTON, E. M.; BURK, J. A.; LIEBLER, D. C.; ROSS, D. The reduction of alpha-tocopherol quinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alpha-tocopherol hydroquinone as a cellular antioxidant. **Mol. Pharmacol.**, v. 52, n. 2, p. 300-305, 1997.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. In: \_\_\_\_\_. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants**. New York: Academic Press. 1991. p. 15-22.

SIESS, W. Molecular mechanisms of platelet activation. **Physiol. Rev.**, v. 69, n.1, p. 58-178, 1989.

SIESS, W.; GUATRE CASAS, P.; LAPETINA, E. G. A role for cyclooxygenase products in the formation phosphatidic acid in stimulated human platelets. Differential mechanism of action of thrombin and collagen. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 4683-4686, 1983.

SINNHUBER, R. O.; YU, T. C. Characterization of the pigment formed in the 2-thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. **Food Res.**, v. 23, p. 626-633, 1958.

SITTIE, A. A.; LEMMICH, E.; OLSEN, C. E.; HAVIID, L.; KHARAZMI, A.; NKRUMAH, F. K.; CHRISTENSEN, S. B. Structure-activity studies: in vitro antileishmanial and malarial activity of anthraquinones from *Morinda lucida*. **Planta Med.**, v. 65, n. 3, p. 259-261, 1999.

SIU, A. W.; REITER, R. J.; TO, C. H. The efficacy of vitamin E and melatonin as antioxidants against lipid peroxidation in rat retinal homogenates. **J. Pineal Res.**, v. 24, n. 4, p. 239-244, 1998.

SMITH, W. L. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. **Biochem. J.**, v. 259, p. 315-324, 1989.

STEEN, K. H., STEEN, A. E., KREYSEL, H. W., REEH, P. W. Inflammatory mediators potentiate pain induced by experimental tissue acidosis. **Pain**, v. 66, p. 163-170, 1996.

STEINER, M.; ANASTASI, J. Vitamin E, an inhibitor of the platelet release reaction. **J. Clin. Invest.**, v. 57, p. 732-737, 1976.

STEINER, M. Influence of vitamin E on platelet function in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 10, n. 5, p. 466-473, 1991.

STOCKS, J.; GUTTERIDGE, J. M. C.; SHARP, R. J.; DORMANDY, T. L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. **Clin. Sci. Mol. Med.**, v. 47, p. 215-222, 1974.

SUNO, M.; NAGAOKA, A. Inhibition of lipid peroxidation by a novel compound (CV-2619) in brain mitochondria and mode of action of the inhibition. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 125, p. 1046-1052, 1984.

SUNO, M.; TERASHITA, Z.; NAGAOKA, A. Inhibition of platelet aggregation by idebenone and the mechanism of the inhibition. **Arch. Gerontol. Geriatr.**, v. 8, p. 313-321, 1989.

TAKAHARA, K.; MURRAY, R.; FITZGERALD, G. A.; FITZGERALD, D. J. The response to thromboxane A<sub>2</sub> in human platelets: discrimination of two binding sites linked to distinct effector systems. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 6836-6844, 1990.

TAKAHASHI, O. Characteristics of rat platelet and relative contributions of platelets and blood coagulation to haemostasis. **Food Chemical Toxicol.**, v. 28, p. 203-218, 2000.

TANAKA, T.; ITO, S.; HIGASHINO, R.; FUKUTA, Y. A new thromboxane receptor antagonist, Z-335, ameliorates experimental thrombosis without prolonging the rat tail bleeding time. **Thromb. Res.**, v. 91, p. 229-235, 1998.

TENG, C. M.; LI, H. L.; WU, T. S.; HUANG, S. C.; HUANG, T. F. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. **Thromb. Res.**, v. 66, p. 549-557, 1992.

TENG, C. M.; LIN, C. H.; LIN, C. N.; CHUNG, M. I.; HUANG, T. F. Frangulin B, an antagonist of collagen - induced platelet aggregation and adhesion, isolated from *Rammus formosana*. **Thromb. Haemostas.**, v. 70, p. 1014-1018, 1993.

TENG, C. M.; KO, F. N. Antiplatelet agents isolated from medicinal plants. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.**, v. 102, n.3, p. 211-225, 1998.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.



TRIPATHI, Y. B.; SHUKLA, S.; SHARMA, M.; SHUKLA, V. K. Antioxidant property of *Rubia cordifolia* extract and its comparison with vitamin E and parabenzoquinone. **Phytother. Res.**, v. 9, p. 440-443, 1995.

TSAI, C. C.; KAO, C. T.; HSU, C. T.; LIN, C. C.; LIN, J. G. Evaluation of four prescriptions of traditional Chinese medicine: Syh-Mo-Yiin, Guizhi-Fuling-Wan, Shieh-Qing-Wan and Syh-Nih-Sann on experimental acute liver damage in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, p. 213-222, 1997.

TSCHOPP, J. P.; DRISCOLL, E. M.; MU, D. X.; BLACK, S. C.; PIERSCHBACHER, M. D.; LUCCHESI, B. R. Inhibition of coronary artery reocclusion after thrombolysis with an RGD - containing peptide with no significant effect on bleeding time. **Coronary Artery Disease**, v. 4, p. 809-817, 1993.

TSUJI, M.; EZUMI, Y.; ARAI, M.; TAKAYAMA, H. A novel association of Fc receptor gamma - chain with glycoprotein VI and their co - expression as a collagen receptor in human platelets. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 38, p. 23528 - 23531, 1997.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408-414, 1985.

TZENG, S. H.; KO, W. C.; KO, F. N.; TENG, C. M. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb. Res.**, v. 64, p. 91 - 100, 1991.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; MORAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, n. 5, p. 547-553, 1994.

VALENZUELA, A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. **Life Sci.**, v. 48, p. 301-309, 1991.

VANAGS, D. M.; RODGERS, S. E.; DUNCAN, E. M.; LLOYD, J. V.; BOCHNER, F. Potentiation of ADP - induced aggregation in human platelet - rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. **Br. J. Pharmacol.**, v. 106, p. 917-923, 1992.

VASILJEVA, O. V.; LYUBITSKY, O. B.; KLEBANOY, G. I.; VLADIMIROV, V. A. Effect of antioxidants on the kinetics of chain lipid peroxidation in liposomes. **Membr. Cell. Biol.** v. 12, n. 2, p. 223-231, 1998.

VAZQUEZ, B.; AVILA, G.; SEGURA, D.; ESCALANTE, B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe Vera* gel. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, n. 1, p. 69-75, 1996.

VERMYLEN, J.; BADENHORST, P. N.; DECKMYN, H.; ARNOUT, J. Normal mechanisms of platelet function. **Clin. Haematol.**, v. 12, p. 107-151, 1983.

VERVOOT, L. M.; RONDEN, J. E.; THIJSSSEN, H. H. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 54, n. 8, p. 871-876, 1997.

VIANA, M.; BARBAS, C.; BONET, C.; BONET, M. V.; CASTRO, M.; FRAILE, M. V.; HERRERA, E. In vitro effects of a flavonoid- rich extract on LDL oxidation. **Atherosclerosis**, v. 123, n. 1-2, p. 83-91, 1996.

VIDELA, L. A.; VILLENA, M. I.; DONOSO, G.; DE LA FUENTE, J.; LISSI, E. A. Visible chemiluminescence induced by t- butyl hydroperoxide in red blood cell suspensions. **Biochem. Int.**, v. 8, p. 821-830, 1984.

VIDELA, L. A.; FERRER, V.; LISSI, E. A. Effect of aliphatic-aldehydes on the lipid peroxidation and chemiluminescence of biological systems under oxidative stress. **J. Biolumin. Chemilumin.**, v. 12, n. 3, p. 141-148, 1997.

VILLALOBOS, M. A.; CRUZ, J. P.; SMITH-AGREDA, J. M.; CUETS, F. S. Morphological aspects of ferrous salts induced lipid peroxidation and platelet aggregation in human blood. **Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 12, p. 637-640, 1990.

VU, T. K.; HUNG, D. T.; WHEATON, V. I.; COUGHLIN, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. **Cell**, v. 64, p. 1057-1068, 1991.

WANG, J. P.; HSU, M. F.; HSU, T. P.; TENG, C. M. Antihemostatic and antithrombotic effects of capsaicin in comparison with aspirin and indomethacin. **Thromb. Res.**, v. 37, p. 669-679, 1985.

WARD, A.; CLISSOLD, S. P. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 34, n. 1, p. 50-97, 1987.

WANDER WENDE, C.; MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed. Proc.**, v. 15, p. 494, 1956.

WEISS, S. J.; LANPERT, M. B.; TEST, S.T. Long-lived oxidants generated by human neutrophils. Characterization and bioactivity. **Science**, v. 222, p. 625 - 628, 1983.

WHALEY, K.; FERGUSON, A. Molecular aspects of complement activation. **Mol. Aspects Med.**, v. 4, p. 209-273, 1981.

WOOLFE, G., MAC DONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 80, p. 300-307, 1944.

WILLIS, A. L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. **J. Pharm. Pharmac.**, v. 21, p. 126-128, 1969.

WILLOUGHBY, D. A.; COOTE, E.; TURK, J. L. Complement in acute inflammation. **J. Pathol.**, v. 97, n. 2, p. 295-305, 1969.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan - induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p.544-547, 1962.

WISEMAN, H.; LIM, P.; O'REILY, J. Inhibition of liposomal lipid peroxidation by isoflavonoid type phyto-oestrogens from soybeans of different countries of origin. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 24, n. 3, p. 392S, 1996.

WU, C. C.; HUANG, S. W.; HWANG, T. L.; KUO, S. C.; LEE, F. Y.; TENG, C. M. YD-3, a novel inhibitor of protease-induced platelet activation. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 6, p. 1289-1296, 2000.

YAMADA, K.; TANAKA, T.; HAN, D.; SENZAKI, K.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on beta-amyloid-(1-42)-induced learning e memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, n. 1, p. 83-90, 1999.

YARDUMIAN, D. A.; MACKIE, I. J.; MACHIN, S. J. Laboratory investigation of platelet function: a review of methodology. **J. Clin. Pathol.**, v. 39, p. 701-712, 1986.

YESILKAYA, A.; YEGIN, A.; OZDEM, S.; AKSU, T. A. The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroxide - treated erythrocytes. **Int. J. Clin. Lab. Res.**, v. 28, n. 4, p. 230-234, 1998.

YOSHIMOTO, H.; SUEHIRO, A.; KAKISHITA, E. Exogenous nitric oxide inhibits platelet activation in whole blood. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 33, n. 1, p. 109 - 115, 1999.

YU, S. M.; WU, T. S.; TENG, C. M. Pharmacological characterization of cinnamophilin, a novel dual inhibitor of thromboxane synthase and thromboxane A<sub>2</sub> receptor. **Br. J. Pharmacol.**, v. 111, p. 906-912, 1994.

ZUCKER, M. B. Platelet aggregation measure by the photometric method. **Methods Enzymol.**, v. 169, p. 117-133, 1989.