

ELISABETE AMARAL REGO

**Avaliação da Actividade
Anti-inflamatória de Plantas dos
Açores**

Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E
DESENVOLVIMENTO

PONTA DELGADA, 2012

ELISABETE AMARAL REGO

Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores

Projecto apresentado na Universidade dos Açores, para
obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Orientador científico | Doutora Maria do Carmo Barreto



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E
DESENVOLVIMENTO

PONTA DELGADA, 2012

Agradecimentos

A construção desta tese não teria sido possível sem a contribuição de algumas pessoas que merecem a minha especial consideração. A todos os que estiveram presentes de uma forma ou de outra, expresso o meu sincero agradecimento.

- À minha orientadora, Professora Doutora Maria do Carmo Barreto, por me ter acolhido na realização desta tese, por todos os conhecimentos transmitidos, pela sua incessante preocupação em me fornecer todos os meios possíveis para a realização do trabalho de investigação. Por ter incitado em mim a procura pela exigência em tudo o que realizava. Foram as suas recomendações e sugestões e a sua busca incansável por uma ciência clara e objectiva que possibilitaram a realização deste trabalho;
- À coordenadora do mestrado, Professora Doutora com Agregação, Maria Manuela de Medeiros Lima pela prontidão com que respondeu a questões de funcionamento do mestrado e pelas suas recomendações;
- À Professora Doutora Helena Gaspar da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pela realização das análises em HPLC, pelas sugestões e esclarecimento de dúvidas;
- Ao professor Doutor José Batista e à professora Doutora Elisabete Lima por terem-me aceite nesta instituição aquando da realização do meu estágio ao abrigo do programa Estagiar L e pela forma com que espicaçaram o meu interesse pela investigação;
- Ao Matadouro de São Miguel, pelo fornecimento de sangue de suíno necessário à realização de um dos ensaios;
- À *Cayman Chemical Co.* pela sempre disponibilidade demonstrada em responder às dúvidas colocadas;
- Ao Senhor Roberto Resendes pelos conhecimentos botânicos transmitidos e não só. Pela amizade e disponibilidade demonstradas na recolha e identificação das duas plantas estudadas;
- À senhora Helena Figueiredo pelo auxílio técnico e amizade demonstrada;
- Aos meus pais por terem sido o meu porto de abrigo durante toda a vida. Foi por causa deles que sou hoje quem sou e por terem acreditado em mim. Sem eles,

não estaria hoje aqui. Seja pelo apoio financeiro ou apoio emocional, estou em dívida para com eles.

- À Dr.^a. Sara Rego por ter dado um novo sentido à palavra amizade. Foi ela que passou e viveu comigo os altos e baixos ao longo deste ano, por ter aturado e acalmado as minhas constantes preocupações. Já são 8 anos a ultrapassar muitas etapas lado a lado.
- Ao meu irmão Christopher Rego, pelas suas sugestões e ajuda nos momentos mais difíceis.
- Queria deixar um agradecimento especial ao Dr. Andreu Fulquet, amigo e colega de laboratório ao longo deste ano. Com a sua boa disposição, o trabalho laboratorial tornou-se menos monótono;
- Aos colegas do DCTD Dr.^a Vera Gouveia e a Dr.^a Ana Borges, pela disponibilidade e pelo auxílio prestados no trabalho laboratorial;
- À amiga Carolina Rodrigues, minha companheira neste percurso, por todo o auxílio prestado e pela discussão de ideias. Espero tê-la ajudado tanto como ela a mim;
- Aos meus amigos Ana Bettencourt, Ana Ferreira, Ana Lima, Ana Carreiro, Carolina Anjos, Luísa Correia, Marisa Oliveira, Raquel Furtado, Sara Jérez e Telmo Eleutério que compartilharam comigo momentos de conquistas, frustrações e cansaço;
- Merecem ainda uma especial nota de apreço os meus colegas de licenciatura e mestrado por ter trocado conhecimentos com eles na realização de trabalhos em conjunto;
- A todos os que não referi, por lapso ou esquecimento, o meu muito obrigado!

ÍNDICE

Resumo -----	ix
Abstract -----	xi
Lista de Siglas e Abreviaturas -----	xiii
Introdução -----	1
Objectivos -----	3
I - Revisão Bibliográfica -----	4
1 - Processo inflamatório-----	5
1.1- Mediadores químicos do processo inflamatório-----	7
1.1.1 - Aminas vasoactivas-----	8
1.1.2 - Bradicinina-----	9
1.1.3 - Enzimas lisossomais-----	9
1.1.4 - Radicais livres-----	10
1.1.5 - Factor activador de plaquetas (PAF)-----	11
1.1.6 - Eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos)-----	11
1.2 - Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)-----	16
1.2.1 - Inibidores não selectivos de COX-----	17
1.2.2 - Inibidores selectivos de COX-2-----	18
1.2.3 - Inibidores de COX/LOX: o futuro da terapia anti-inflamatória?-----	19
2 - Actividade anti-inflamatória na medicina popular-----	20
2.1 - Plantas medicinais com actividade anti-inflamatória -----	20
2.2 - Metabolitos secundários-----	21
2.2.1 - Polifenóis-----	21
2.2.2 - Saponinas-----	21
2.2.3 - Flavonóides-----	22
2.2.4 - Ácidos fenólicos-----	24
2.2.5 - Triterpenos e esteróides -----	25
2.2.6 - Alcalóides -----	27
3 - Espécies vegetais estudadas -----	27
3.1 - <i>Ilex perado</i> Aiton ssp. <i>azorica</i> (Loes.) Tutin (Aquifoliaceae) -----	27
3.2 - <i>Umbilicus rupestris</i> (Salisb.) Dandy (coucelos) (Crassulaceae) -----	29

II - Material e Métodos -----	32
1 - Material vegetal-----	33
2 - Preparação dos extractos-----	33
2.1 - Extractos brutos-----	33
2.2 - Fraccionamento dos extractos brutos nas fracções de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etilo -----	34
2.3 - Fraccionamento cromatográfico das fracções-----	36
2.3.1 - <i>Ilex perado</i> -----	37
2.3.2 - <i>Umbilicus rupestris</i> -----	38
3 - Análise fitoquímica-----	38
3.1 - Análise fitoquímica dos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e <i>U. rupestris</i> em TLC-----	38
3.2 - Análise fitoquímica das sub-fracções de <i>I. perado</i> em HPLC -----	39
4 - Avaliação da actividade anti-inflamatória <i>in vitro</i> -----	40
4.1 - Inibição da desnaturação da albumina-----	40
4.2 - Teste de estabilidade da membrana-----	41
4.3 - Inibição da acção da protease tripsina-----	43
4.4 - Ensaio de inibição das enzimas cicloxigenase 1 e 2-----	44
4.5 - Ensaio de inibição da enzima 15-lipoxigenase-----	46
5 - Análise estatística-----	47
III - Resultados -----	48
1 - Efeito dos extractos e fracções na inibição da desnaturação da albumina-----	49
1.1 - <i>Ilex perado</i> -----	49
1.2 - <i>Umbilicus rupestris</i> -----	51
2 - Efeito dos extractos e fracções na estabilização da membrana-----	52
2.1 - <i>Ilex perado</i> -----	53
2.2 - <i>Umbilicus rupestris</i> -----	53
3 - Efeito dos extractos e fracções na inibição da acção da protease tripsina-----	55
3.1 - <i>Ilex perado</i> -----	55
3.2 - <i>Umbilicus rupestris</i> -----	56
4 - Efeito das sub-fracções na actividade da cicloxigenase 1 e 2-----	58
5 - Efeito das sub-fracções na actividade da 15-lipoxigenase-----	60
6 - Análise fitoquímica-----	62

6.1- Perfil fitoquímico dos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e <i>U. rupestris</i> em TLC-----	62
6.2- Análise fitoquímica das sub-fracções de <i>I. perado</i> em HPLC-----	63
IV - Discussão -----	69
Conclusão -----	73
Perspectivas de trabalho futuro -----	74
Referências Bibliográficas -----	75
Anexos -----	xvi
Anexo I - Reveladores para cromatografia em camada fina-----	xvi
Anexo II - Inibição da desnaturação da albumina-----	xvii
Anexo III - Teste de estabilidade da membrana-----	xviii
Anexo IV - Inibição da acção da protease tripsina-----	xx
Anexo V - Inibição das enzimas cicloxigenase 1 e 2-----	xxi
Anexo VI - Inibição da enzima 15-lipoxigenase-----	xxix

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos da resposta inflamatória aguda-----	6
Figura 2 - Mecanismos da resposta inflamatória crónica-----	7
Figura 3 - Biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico-----	12
Figura 4 - Via da cicloxigenase-----	13
Figura 5 - Resveratrol-----	21
Figura 6 - Estrutura de saponinas esteróides (A) e triterpenóides (B)-----	22
Figura 7 - 2-fenil-benzopirona-----	22
Figura 8 - Flavonóides isolados de plantas-----	24
Figura 9 - Éster fenetil do ácido cafeico-----	25
Figura 10 - Triterpenos isolados de plantas-----	26
Figura 11 - Esteróides isolados de <i>Clavularia viridis</i> Quoy & Gaim (Clavularidae)-----	26
Figura 12 - Berberina-----	27
Figura 13 - <i>Ilex perado</i> Aiton-----	28
Figura 14 - <i>Umbilicus spp</i> -----	29
Figura 15 - Estrutura de uma matesaponina-----	31
Figura 16 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de acetona de <i>I. perado</i> -----	35
Figura 17 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de etanol de <i>I. perado</i> -----	35
Figura 18 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de acetona de <i>U. rupestris</i> -----	36
Figura 19 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de etanol de <i>U. rupestris</i> -----	36
Figura 20 - Esquema do ensaio imuno-enzimático-----	46
Figura 21 - Percentagens de inibição da desnaturação da albumina pelos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e o padrão AAS à concentração de 0,50 mg/mL-----	50
Figura 22 - Percentagens de inibição da desnaturação da albumina pelos extractos e fracções de <i>U. rupestris</i> e o padrão AAS à concentração de 0,50	

mg/mL-----	51
Figura 23a e 23b - Percentagens de estabilização da membrana dos eritrócitos pelos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e o padrão AAS às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20 mg/mL-----	53
Figura 24a e 24b - Percentagens de estabilização da membrana dos eritrócitos pelos extractos e fracções de <i>U. rupestris</i> e o padrão AAS às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20 mg/mL-----	53
Figura 25 - Percentagens de estabilização da membrana pelos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e <i>U. rupestris</i> e o padrão AAS à concentração de 0,10 mg/mL-----	54
Figura 26 - Percentagens de inibição da actividade da cicloxigenase 1 e 2 pelas sub-fracções e o padrão indometacina à concentração de 0,025 mg/mL-----	59
Figura 27 - Percentagens de inibição da actividade da lipoxigenase pelas sub-fracções e o padrão quercetina à concentração de 0,025 mg/mL-----	61
Figura 28 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.1-----	64
Figura 29 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.2-----	65
Figura 30 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.3-----	66
Figura 31 - Perfis UV de cafeína (a), teofilina (b), ácido salicílico (c), ácido acetilsalicílico (d) ácido gálico (e) e quercetina (f)-----	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de clorofórmio do extracto bruto de acetona de <i>I. perado</i> -----	37
Tabela 2 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de hexano do extracto bruto de etanol de <i>I. perado</i> -----	37
Tabela 3 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de hexano do extracto bruto de etanol de <i>U. rupestris</i> -----	38
Tabela 4 - Inibição da acção da tripsina pelos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e o padrão AAS-----	56
Tabela 5 - Inibição da acção da tripsina pelos extractos e fracções de <i>U. rupestris</i> e o padrão AAS-----	57
Tabela 6 - Perfis fitoquímicos dos extractos e fracções de <i>I. perado</i> e <i>U. rupestris</i> -----	62

RESUMO

A maioria do tratamento de patologias que envolvem a inflamação baseia-se no bloqueio da produção de eicosanóides após a libertação do ácido araquidónico dos fosfolípidos membranares pela acção da fosfolipase A₂. Os fármacos mais frequentemente prescritos no tratamento de doenças que têm por base uma resposta inflamatória são os anti-inflamatórios não esteróides, como a aspirina, o ibuprofeno e o diclofenac. Estes actuam pela inibição não selectiva das enzimas cicloxigenase 1 e 2, responsáveis pela produção de prostaglandinas no processo inflamatório. No entanto, os efeitos secundários que advêm do seu uso prolongado representam um grande problema clínico. Os metabolitos secundários derivados de plantas representam uma importante fonte de compostos anti-inflamatórios e sabe-se que muitos destes interferem no metabolismo do ácido araquidónico, através da inibição da cicloxigenase e lipoxigenase. A cicloxigenase 1 e 2 levam à produção de prostaglandinas pró-inflamatórias e a 15-lipoxigenase influencia a progressão da aterosclerose. Contudo, a inibição preferencial da cicloxigenase-2 sobre a cicloxigenase-1 é mais viável, uma vez que esta última é produzida em muitos processos homeostáticos. *Ilex perado* Aiton ssp. *azorica* (Loes.) Tutin, de nome comum “azevinho” é uma planta endémica dos Açores e é relacionada filogeneticamente com *Ilex paraguariensis*, planta tradicionalmente utilizada na América do Sul para o tratamento de artrite reumatóide e outras patologias inflamatórias. *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, comumente designada de “coucelos”, é utilizada para o tratamento de inflamações nos Açores. Como parte do estudo, cujo objectivo principal é a descoberta de novos compostos anti-inflamatórios, foi avaliada a actividade anti-inflamatória de *I. perado* e *U. rupestris* em diversos mecanismos da cascata inflamatória no sentido de se obter no final compostos com capacidade de inibição elevada sobre as enzimas cicloxigenase-2 e 15-lipoxigenase.

Numa fase inicial do trabalho, estudou-se o potencial anti-inflamatório das fracções de hexano, diclorometano, clorofórmio e de acetato de etilo de *I. perado* e *U. rupestris* em ensaios de *screening* baseados em diferentes mecanismos inflamatórios: inibição da desnaturação da albumina, inibição da hemólise induzida pelo calor e inibição da acção da protease tripsina. As fracções mais activas foram as de hexano e clorofórmio de *I. perado* e a fracção de hexano de *U. rupestris*, sendo que estas evidenciaram actividades pronunciadas de inibição da desnaturação da albumina e da

acção da protease tripsina. Seguidamente, estas fracções foram submetidas a fraccionamentos por cromatografia em camada fina, tendo-se obtido sete sub-fracções de *I. perado* e duas de *U. rupestris*. As percentagens de inibição das enzimas cicloxigenase-1, cicloxigenase-2 e 15-lipoxigenase causadas pelas sub-fracções foram estudadas. Constatou-se que as sub-fracções mais activas foram as de clorofórmio de *I. perado* com percentagens de inibição da cicloxigenase 1 e 2 próxima da indometacina e capacidade inibidora da 15-lipoxigenase semelhante à quercetina. No entanto, a sub-fracção mais polar (IP 1.3.3) foi a que evidenciou actividade de inibição selectiva da cicloxigenase-2 e da 15-lipoxigenase à mesma concentração (0,025 mg/mL). Os compostos responsáveis por esta actividade parecem ser de natureza polar, pertencendo ao grupo de compostos das xantinas. Estes resultados são, então, promissores para a descoberta de fármacos alternativos aos anti-inflamatórios comercializados. Por seu turno, as sub-fracções de *U. rupestris* evidenciaram pouca a nenhuma inibição destas enzimas.

Palavras-chave: 15-lipoxigenase, actividade anti-inflamatória, cicloxigenase-1, cicloxigenase-2, *Ilex perado*, *Umbilicus rupestris*.

ABSTRACT

Most of the treatments of pathologies that involve inflammation are based on the blockade of eicosanoid production after arachidonic acid release from membrane phospholipids by the action of phospholipase A₂. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are the most frequently prescribed for the treatment of inflammatory diseases such as aspirin, ibuprofen and diclofenac. They act through non-selective inhibition of cyclooxygenase 1 and 2, responsible for prostaglandins production in the inflammatory process. However, the side effects arising from their prolonged use are a major clinical problem. Secondary metabolites derived from plants are a significant source of anti-inflammatory compounds and it is known that many of these interfere with the arachidonic acid metabolism, by inhibiting both cyclooxygenase and lipoxygenase. Cyclooxygenase 1 and 2 lead to the production of pro-inflammatory prostaglandins and 15-lipoxygenase influences the progression of atherosclerosis. However, the selective inhibition of cyclooxygenase-2 over cyclooxygenase-1 is more viable, since the latter is produced in many homeostatic processes. *Ilex perado* Aiton ssp. *azorica* (Loes.) Tutin, with the common name “azevinho”, is an endemic plant of the Azores and shares the same genus of *Ilex paraguariensis*, plant traditionally used in South America for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory disorders. *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, commonly referred to as “coucelos”, is used to treat topical inflammation in the Azores. As part of the study, whose main objective is to discover new anti-inflammatory compounds, the anti-inflammatory activity of *I. perado* and *U. rupestris* was evaluated in various mechanisms of the inflammatory cascade in order to obtain in the end compounds capable of a high inhibition of the enzymes cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase.

At an early stage of the research work, the anti-inflammatory potential of hexane, dichloromethane, chloroform and ethyl acetate fractions of *I. perado* and *U. rupestris* was studied, using screening assays based on distinct inflammatory mechanisms: inhibition of albumin denaturation, inhibition of heat induced hemolysis and inhibition of trypsin protease action. *I. perado* hexane and chloroform fractions and *U. rupestris* hexane fraction were the most active. These fractions showed pronounced inhibition of albumin denaturation and inhibition of trypsin protease action. Subsequently, these fractions were fractionated through thin layer chromatography,

yielding seven sub-fractions of *I. perado* and two of *U. rupestris*. The percentage inhibition of cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase caused by the sub-fractions was evaluated. It was found that the most active samples were *I. perado* chloroform sub-fractions with percentage inhibition of cyclooxygenase 1 and 2 near the inhibitory capacity of indomethacin and 15-lipoxygenase inhibition capacity similar to quercetin. However, the most polar sub-fraction (IP 1.3.3) was the only that demonstrated selective inhibition of cyclooxygenase-2 and 15-lipoxygenase at the same concentration (0.025 mg/mL). The compounds responsible for this action seem to be polar in nature, belonging to the group of xanthines. These results are thus promising on the discovery of alternative drugs to marketed anti-inflammatory drugs. On the other hand, *U. rupestris* sub-fractions showed little to no inhibition of these enzymes.

Key words: 15-lipoxygenase, anti-inflammatory activity, cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2, *Ilex perado*, *Umbilicus rupestris*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5-HT** - Serotonina ou 5-hidroxitriptamina
5-HT₁ - Receptor 1 da 5-hidroxitriptamina
5-HT₂ - Receptor 2 da 5-hidroxitriptamina
5-HT₃ - Receptor 3 da 5-hidroxitriptamina
5-HT₄ - Receptor 4 da 5-hidroxitriptamina
5-LOX - 5-lipoxigenase
8-LOX - 8-lipoxigenase
12-LOX - 12-lipoxigenase
15-LOX - 15-lipoxigenase
Abs - Absorvância
AINE - Anti-inflamatório não esteróide
ANOVA - Análise de variância
B₁ - Receptor 1 da bradicinina
B₂ - Receptor 2 da bradicinina
BSA - Albumina de soro bovino
Cisteinil-LTs - Cisteinil-leucotrienos
COX - Cicloxigenase
COX-1 - Cicloxigenase 1
COX-2 - Cicloxigenase 2
CysLT₁ - Receptor 1 dos cisteinil-leucotrienos
DAD - Diode Array Detector
DCM - Diclorometano
DMF - Dimetil formamida
DMSO - Dimetilsulfóxido
DP₁ - Receptor 1 da prostagladina D₂
DP₂ - Receptor 2 da prostagladina D₂
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA - Ensaio imuno-enzimático
EP₁ - Receptor 1 da prostagladina E₂
EP₂ - Receptor 2 da prostagladina E₂
EP₃ - Receptor 3 da prostagladina E₂

EP₄ - Receptor 4 da prostagladina E₂
EtOAc - Acetato de etilo
EtOH - Etanol
FDA - Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América
FP - Receptor da prostagladina F_{2α}
H₁ - Receptor de histamina
HETE - Ácido hidroxieicosatetranóico
HPETE - Ácido hidroxiperoxieicosatetranóico
HPLC - Cromatografia líquida de alta pressão
IC₅₀ - Concentração necessária para inibir a actividade em 50%
IL-1β - Interleucina 1β
IL-6 - Interleucina 6
ICAM-1 - Molécula de adesão intercelular 1
IgE - Imunoglobulina E
IP - Receptor da prostaciclina
iNOS - Sintetase de óxido nítrico induzível
Isomerase PGE - Isomerase da prostaglandina E₂
IS - Índice de Selectividade
LOX - Lipoxigenase
NOS - Sintetases de óxido nítrico
PAF - Factor activador de plaquetas
PGI₂ - Prostaciclina
PMN - Polimorfonuclear
RNS - Espécies reactivas de azoto
ROS - Espécies reactivas de oxigénio
Rt - Tempo de retenção
Sintetase PGI - Sintetase da prostaciclina
Sintetase PGD - Sintetase da prostaglandina D₂
Sintetase PGF - Sintetase da prostaglandina F_{2α}
Sintetase TXA - Sintetase do tromboxano A₂
TLC - Cromatografia de camada fina
TNF-α - Factor de necrose tumoral alfa
TP - Receptor do Tromboxano A₂
TXA₂ - Tromboxano A₂

TXB₂ - Tromboxano B₂

VCAM-1 - Molécula de adesão vascular 1

VSMCs - Células vasculares do músculo liso

Siglas das amostras

A - extracto de acetona

AA - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona

AAS - ácido acetilsalicílico

AC - fracção de clorofórmio do extracto de acetona

AD - fracção de diclorometano do extracto de acetona

AH - fracção de hexano do extracto de acetona

E - extracto de etanol

EA - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol

EC - fracção de clorofórmio do extracto de etanol

ED - fracção de diclorometano do extracto de etanol

EH - fracção de hexano do extracto de etanol

IP - *Ilex perado*

UR - *Umbilicus rupestris*

INTRODUÇÃO

O processo inflamatório ou resposta inflamatória caracteriza-se por ser uma reacção de defesa do organismo perante a exposição a estímulos prejudiciais. A reacção inflamatória pode ser aguda, se o tecido conseguir ser reparado sem o aparecimento de sequelas, ou crónica quando o agente inflamatório não é eliminado ou a resposta inflamatória é persistente (Serhan *et al.*, 2010; Trowbridge & Emling, 1997). A inflamação crónica está na base do aparecimento de diversas doenças crónicas como a artrite reumatóide, cancro, asma, doenças auto-imunes (Serhan *et al.*, 2010) ou até a aterosclerose (Charo & Taub, 2011).

A resposta inflamatória é controlada pela presença de diversos mediadores químicos, cada qual com uma função específica numa fase da reacção inflamatória (Trowbridge & Emling, 1997). Uma das mais importantes classes de mediadores lipídicos são os eicosanóides. Os eicosanóides incluem as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas. São moléculas de sinalização produzidas através de uma via oxidativa do ácido araquidónico (Harizi *et al.*, 2008). As cicloxigenases (COX) 1 e 2 são responsáveis pela biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido araquidónico (Charlier & Michaux, 2003). A 15-lipoxigenase (LOX) converte o ácido araquidónico em hidroperóxidos e lipoxinas (Dobrian *et al.*, 2011).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) tradicionais como a aspirina, o ibuprofeno e o diclofenac são dos mais utilizados no tratamento de doenças que têm por base uma resposta inflamatória e actuam através da inibição não selectiva das enzimas COX-1 e COX-2. No entanto, os efeitos secundários que advêm do seu uso prolongado representam um grande problema clínico (Martel-Pelletier *et al.*, 2003). Por outro lado, os AINEs inibidores selectivos da COX-2 levam a complicações do foro renal e cardiovascular, apesar de serem eficazes (Charlier & Michaux, 2003; Gambaro, 2002; Rao & Knaus, 2008). A importância da inibição simultânea da produção de prostaglandinas pela via da COX e da produção de leucotrienos pela via da LOX já foi descrita por diversos autores (Burnett *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Martel-Pelletier *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2008). A inibição preferencial da COX-2 sobre a COX-1 aliada à inibição da 15-LOX constitui uma importante alternativa aos AINEs tradicionais no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios (Charlier & Michaux 2003; Reddy *et al.*, 2008). Contudo, um fármaco

que tenha uma actividade de inibição dupla de COX/LOX não é flexível o suficiente para conseguir uma inibição óptima das duas enzimas. Ou seja, dificilmente a dose usada para inibir a COX é a mesma para inibir a LOX. Uma abordagem mais promissora e executável é a utilização de dois fármacos diferentes que possuam, respectivamente, actividades anti-COX e anti-LOX pronunciadas. Portanto, obtém-se um melhor resultado terapêutico pela variação das doses de ambos os fármacos (Butovich & Lukyanova, 2008).

Já foram identificadas, isoladas e testadas várias moléculas de origem natural relativamente às suas actividades farmacológicas. As moléculas activas existentes nas plantas têm fornecido as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de moléculas sintéticas mais eficazes (Agnihotri *et al.*, 2010). A maior parte dos metabolitos secundários derivados das plantas interferem directa ou indirectamente com diversos mediadores inflamatórios de entre os quais se encontram os metabolitos do ácido araquidónico (Calixto *et al.*, 2003).

As ilhas dos Açores ostentam uma flora riquíssima pelo que assume extrema relevância a pesquisa de compostos químicos anti-inflamatórios em plantas dos Açores. Para este estudo, foram seleccionadas as espécies vegetais *Ilex perado* Aiton subsp. *azorica* (Loes.) Tutin, de nome comum “azevinho” e *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, comumente designada “coucelos”. A primeira foi escolhida por ser endémica e por ainda não existirem estudos relativamente às suas propriedades farmacológicas. Além disso, partilha o mesmo género de plantas usadas no tratamento de inflamações como *Ilex paraguariensis* e *Ilex pubescens* (Bracesco *et al.*, 2011; Puangpraphant & Mejia, 2009; Wang *et al.*, 2008). Já a planta *U. rupestris* foi seleccionada por ser usada na medicina popular dos Açores, particularmente as folhas frescas, que são indicadas e utilizadas topicamente como anti-inflamatórias (Corsépius, 1997), sendo que ainda não foram efectuados estudos relacionados com as suas propriedades farmacológicas.

Com este estudo, pretendeu-se avaliar a actividade anti-inflamatória de *I. perado* e *U. rupestris* no sentido de se encontrar compostos ou grupos de compostos como os polifenóis, saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos, triterpenos e esteróides e/ou alcalóides, que exibissem uma selectividade de inibição para a COX-2 em relação à COX-1 competindo, deste modo, com os anti-inflamatórios comercializados na sua eficácia e na redução de efeitos secundários e apresentassem uma inibição da 15-LOX, enzima envolvida no processo aterosclerótico.

OBJECTIVOS

O projecto de investigação, desenvolvido no âmbito do 2º ano curricular do mestrado em Ciências Biomédicas apresentado sob a forma de dissertação, teve como objectivos gerais avaliar a potencial actividade anti-inflamatória das espécies *Ilex perado* Aiton subsp. *azorica* (Loes.) Tutin e *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy, utilizando modelos *in vitro*, e realizar um estudo fitoquímico das suas sub-frações.

Os objectivos específicos foram os seguintes:

- Fraccionamento dos extractos de acetona e de etanol de *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy e *Ilex perado* Aiton ssp. *azorica* (Loes.) Tutin por partição líquido-líquido;
- Avaliação da actividade anti-inflamatória dos extractos e fracções obtidas através de métodos de *screening*: inibição da desnaturação da albumina, inibição da hemólise induzida pelo calor e inibição da acção da protease tripsina;
- Fraccionamento por cromatografia preparativa em camada fina (TLC) das fracções com maior actividade nos ensaios de *screening*;
- Avaliação das sub-frações obtidas na inibição da actividade da COX-1, COX-2 e 15-LOX;
- Comparação da actividade anti-inflamatória das amostras de *I. perado* e *U. rupestris* com anti-inflamatórios comercializados;
- Análise fitoquímica das sub-frações de modo a identificar os compostos ou grupos de compostos responsáveis pela actividade anti-inflamatória demonstrada

I - Revisão

Bibliográfica

1 - Processo inflamatório

O processo inflamatório ou reacção inflamatória consiste num sistema inato de respostas celulares e vasculares causadas por estímulos e condições prejudiciais como infecções, exposição ao calor ou ao frio, isquémia ou trauma tecidual, em que o organismo tenta restaurar o tecido (Medzhitov, 2008; Serhan *et al.*, 2010). Se controlada, a resposta inflamatória tem efeitos benéficos (por exemplo, no fornecimento de protecção em situações de infecção), contudo, pode tornar-se prejudicial se for desregulada (por exemplo, causando choque séptico) (Medzhitov, 2008).

A reacção inflamatória pode ser aguda, se o tecido consegue ser reparado sem o aparecimento de sequelas, ou crónica quando o agente inflamatório não é eliminado ou a resposta inflamatória é persistente (Serhan *et al.*, 2010; Trowbridge & Emling, 1997). A resposta inflamatória aguda é definida como uma série de respostas de tecidos que podem ocorrer nas primeiras horas seguidas ao dano. Os eventos vasculares que estão na base desta resposta são a activação das células endoteliais, abertura reversível das junções das células endoteliais, adesão dos leucócitos polimorfonucleares (PMNs), agregação das plaquetas e hemorragia (**Figura 1**) (Serhan *et al.*, 2010). As células endoteliais activadas expressam na sua superfície moléculas de adesão para os leucócitos e promovem a produção e libertação de citocinas e quimiocinas, que, por sua vez, atraem por quimiotaxia e activam os leucócitos PMNs. Os leucócitos PMNs activados aderem ao endotélio antes de saírem do compartimento vascular. A abertura reversível das junções das células epiteliais, causada pela histamina, serotonina e outros factores, permite o extravasamento de proteínas e fluídos para o espaço extravascular, levando ao aparecimento de edema. Nesta sequência, os leucócitos PMNs activados migram através destas junções para o tecido lesado. Uma outra característica da reacção inflamatória aguda é a activação das plaquetas que está, normalmente, associada à conversão da protrombina em trombina. Daqui resulta a adesão das plaquetas umas às outras (agregação das plaquetas). Finalmente, a resposta inflamatória aguda pode estar relacionada com a hemorragia proveniente do dano estrutural directo (reversível ou irreversível) à barreira endotelial. O aparecimento de hemorragia implica que a integridade do vaso foi danificada, pelo que os eritrócitos saem do vaso passivamente. Este evento ocorre após um choque térmico, em situações de disfunção severa das plaquetas, após infecções devido à libertação de toxinas, ou outras situações (Serhan *et*

al., 2010; Trowbridge & Emling, 1997). Uma das consequências do processo inflamatório é o aumento de temperatura local. Este aumento pode causar desnaturação de proteínas estruturais e enzimáticas. Quando tal ocorre, as proteínas tornam-se disfuncionais (Tortora & Derrickson, 2009).

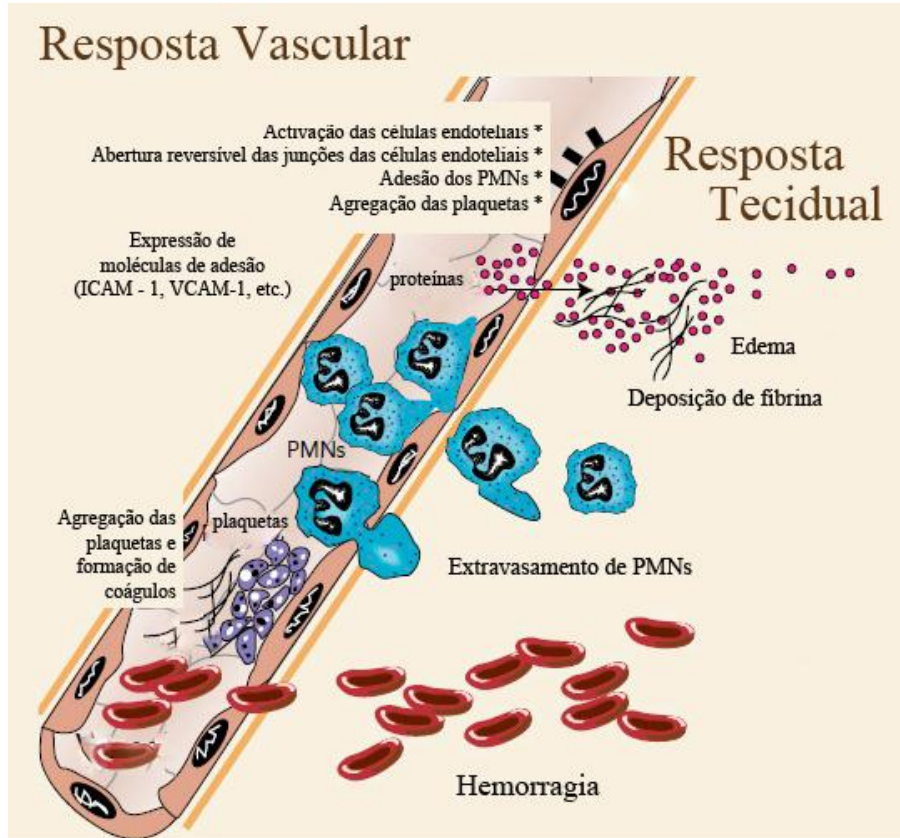


Figura 1 - Mecanismos da resposta inflamatória aguda. Estão representados os eventos de resposta vascular inicial que levam às alterações de permeabilidade, activação das células endoteliais (expressão aumentada das moléculas de adesão para os neutrófilos PMNs), adesão dos neutrófilos PMNs à superfície endotelial e activação das plaquetas (que resulta na sua agregação, adesão entre si e com a superfície endotelial). As plaquetas encontram-se frequentemente nas zonas de deposição de fibrina. A resposta do tecido (compartimento extravascular) inclui a formação de edema, extravasamento dos PMNs, deposição de fibrina e hemorragia se a integridade estrutural da barreira vascular se encontra comprometida (adaptado de Serhan *et al.*, 2010).

O processo inflamatório crónico é definido morfológicamente pela presença nos tecidos de linfócitos, macrófagos e plasmócitos (**Figura 2**). Em muitos casos, a resposta inflamatória crónica pode persistir por longos períodos (meses ou anos). Considera-se que é causada pela resposta persistente do sistema inato e adquirido, como acontece na artrite reumatóide, cancro, asma e doenças auto-imunes (Serhan *et al.*, 2010).

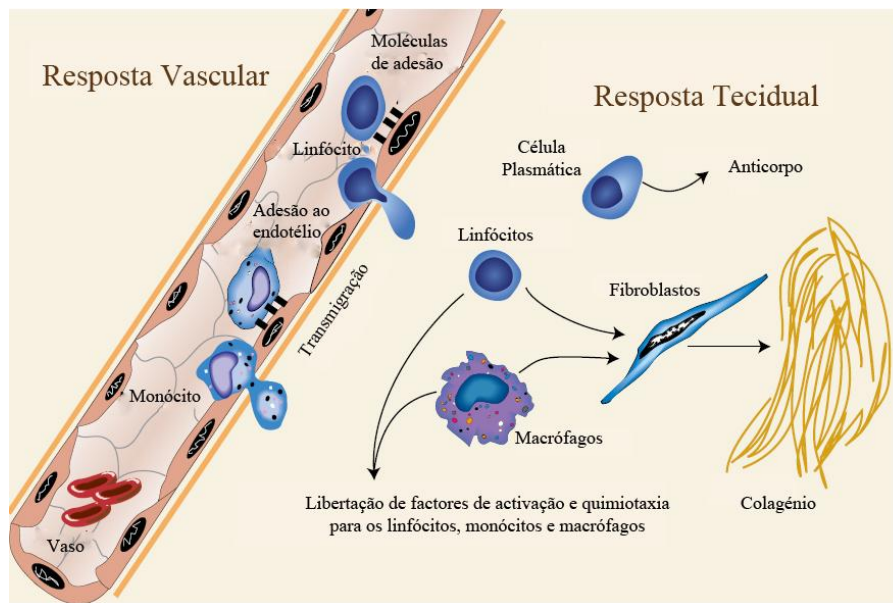


Figura 2 - Mecanismos da resposta inflamatória crônica. Estão representados a adesão dos linfócitos e monócitos ao endotélio activado e o extravasamento destas células para o espaço extravascular. As células endoteliais activadas expressam as moléculas de adesão (como VCAM-1) que facilitam a adesão dos linfócitos e monócitos à superfície endotelial, seguido do seu extravasamento. No compartimento extracelular, os linfócitos e macrófagos secretam factores que estimulam a formação extracelular de colagénio e prolongam a resposta inflamatória. As células plasmáticas secretam diversas subclasses de anticorpos (adaptado de Serhan *et al.*, 2010).

1.1 - Mediadores químicos do processo inflamatório

A resposta inflamatória é condicionada pela presença de mediadores químicos, cada qual com uma função específica numa determinada fase da reacção inflamatória. Estas substâncias podem ser exógenas (quando provêm de agentes bacterianos ou químicos) ou endógenas quanto à sua origem (Trowbridge & Emling, 1997). Serão focadas somente as últimas.

Os mediadores químicos endógenos do sangue, células inflamatórias e tecido lesado participam activamente na resposta inflamatória. Estes mediadores incluem aminas vasoactivas (histamina e serotonina), bradicinina, enzimas lisossomais, radicais livres, o factor activador de plaquetas (PAF) e eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (Barnes *et al.*, 1998; Favacho, 2009; Roome, 2007). Estes mediadores podem ser pré-formados ou sintetizados nas células activadas, em resposta a um estímulo (Barnes *et al.*, 1998).

1.1.1 - Aminas vasoactivas

As aminas vasoactivas encontram-se em grânulos celulares, sendo libertadas imediatamente após a acção do estímulo agressor. Agem principalmente sobre os vasos sanguíneos, e também são responsáveis pela sensação de dor na inflamação, através da sua acção sobre os neurónios sensoriais. As aminas vasoactivas mais importantes são a histamina e a serotonina (Dray, 1995).

A histamina, amina primária hidrossolúvel, é o primeiro mediador implicado nas alterações fisiopatológicas nas doenças inflamatórias. Assume importância nas fases iniciais da inflamação aguda uma vez que medeia a resposta do aumento da permeabilidade vascular (Ohtsu, 2008; Roome, 2007; Trowbridge & Emling, 1997).

A histamina é sintetizada a partir da L-histidina que é catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase no aparelho de Golgi, e depois armazenada nos grânulos dos mastócitos e basófilos. Os mastócitos podem ser encontrados em quase todos os órgãos e tecidos. São necessários para o desenvolvimento da reacção alérgica, anafilaxia e inflamação pela libertação dos mediadores pró-inflamatórios que incluem a histamina, citocinas e leucotrienos e enzimas proteolíticas, após activação e pela degradação dos mastócitos. De entre as substâncias inflamatórias libertadas pelos mastócitos, a histamina é a que está melhor caracterizada e a mais potente mediadora vasoactiva (Roome, 2007). A histamina é, frequentemente, o primeiro mediador a actuar mas a sua acção é breve pois é rapidamente inactivada (Trowbridge & Emling, 1997).

Além dos seus efeitos nos vasos sanguíneos, a histamina medeia a contracção do músculo liso nas vias aéreas e no tracto gastrointestinal e induz a produção de muco nasal. De modo a aumentar a permeabilidade vascular, deve ligar-se a um receptor, H₁, localizado nas células endoteliais. Esta ligação faz com que as células se contraíam, produzindo espaços intercelulares através dos quais as substâncias podem passar (Trowbridge & Emling, 1997).

Tal como a histamina, a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina vasoactiva. É formada pela descarboxilação do triptofano e é armazenada nos grânulos secretores das plaquetas, sendo libertada das plaquetas pelo PAF. A serotonina possui acções semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Favacho, 2009; Roome, 2007; Trowbridge & Emling, 1997). Já foram reconhecidos muitos

receptores da serotonina (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ e 5-HT₄) que são responsáveis por controlar as suas funções biológicas (Roome, 2007).

1.1.2 - Bradicinina

A bradicinina é um péptido obtido da clivagem do precursor inactivo cininogénico pela protease calicreína (Roome, 2007; Trowbridge & Emling, 1997). Existe uma variedade de factores que leva à produção da bradicinina nomeadamente danos teciduais, reacções alérgicas, infecções virais e outros eventos inflamatórios. Existem, pelo menos, dois receptores distintos para este péptido, designadamente B₁ e B₂ (Roome, 2007). A bradicinina é capaz de induzir a dilatação das arteríolas, aumentar a permeabilidade das vénulas, aumentar a síntese de prostaglandinas e causar dor localmente. Tal como a histamina e serotonina, a bradicinina aumenta os espaços entre as células endoteliais e leva a um aumento momentâneo da permeabilidade venular (Favacho, 2009; Roome, 2007; Trowbridge & Emling, 1997).

1.1.3 - Enzimas lisossomais

O citoplasma dos neutrófilos fagocitários e monócitos que são atraídos ao local da inflamação por mediadores químicos contem organelos designados lisossomas. Os lisossomas contêm enzimas potentes capazes de digerir material trazido para o citoplasma durante a fagocitose. Durante a fagocitose, o material é incluído nos vacúolos do citoplasma celular e os lisossomas dissolvem o material pela libertação de enzimas hidrolíticas (Crowley, 2010; Trowbridge & Emling, 1997). Algumas das enzimas lisossomais envolvidas no processo de inflamação são proteases de serina, nomeadamente a catepsina G, a elastase de neutrófilo e a protease 3. Estas proteases estão envolvidas na defesa do organismo contra as infecções mas também regulam a resposta inflamatória pela alteração específica das funções das citocinas e quimiocinas (Kessenbrock *et al.*, 2011; Pham, 2008).

No processo inflamatório, a necrose dos leucócitos inflamatórios envolve o extravasamento de enzimas lisossomais e outras substâncias tóxicas para o espaço extracelular devido ao rebentamento da membrana dos lisossomas (Tortora & Derrickson, 2009; Trowbridge & Emling, 1997).

Apesar de desempenharem um papel fundamental na digestão de substâncias que continuariam a actuar como estímulos inflamatórios, as enzimas lisossomais não estão directamente envolvidas no processo de eliminação destas substâncias. A maioria das enzimas lisossomais actua melhor em pH ácido. Os lisossomas contêm enzimas capazes de activar o sistema complemento o que, por sua vez, é capaz de promover a quimiotaxia, trazendo leucócitos ao local lesado (Trowbridge & Emling, 1997).

1.1.4 - Radicais livres

A produção de radicais está intimamente ligada ao processo inflamatório. O sistema imunitário produz um grande número de substâncias químicas potentes que incluem os radicais livres (Frum, 2006).

O oxigénio é vital nos processos aeróbios e no catabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono que geram energia para o crescimento e actividades físicas e químicas. Contudo, o oxigénio assume também um papel como agente tóxico nos tecidos do organismo. Cerca de 5% ou mais do O₂ inalado é convertido em espécies reactivas de oxigénio (ROS). Portanto, sob condições aeróbias, as células encontram-se ameaçadas de danos causados pelas ROS, que por sua vez são neutralizadas por um sistema antioxidante endógeno. Se o equilíbrio entre a produção de ROS e a defesa antioxidante é perturbado, as células enfrentam stresse oxidativo como é evidente em certas condições inflamatórias e infecciosas (Roome, 2007). As ROS são produzidas pelos neutrófilos quando existem os seguintes estímulos: exposição a agentes quimiotáticos, imunocomplexos e acção de macrófagos. Pequenas alterações nos níveis de radicais livres aumentam a expressão de quimiocinas, de citocinas e de moléculas de adesão. Por outro lado, elevados níveis de radicais livres provocam dano epitelial, activação de proteases e lesão de outros tipos celulares causando lesão tecidual (Wiese, 2008).

No processo inflamatório, os radicais que assumem maior relevância são os derivados do óxido nítrico (Bogdan, 2001; Yen *et al.*, 2001). O óxido nítrico é um radical gasoso lipossolúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e neurónios específicos. É produzido pela conversão de L-arginina a L-citrulina através de três tipos diferentes de sintetases de óxido nítrico (NOS) (Redington, 2006). O óxido nítrico é uma espécie reactiva do azoto (RNS) que, em meio aquoso, reage com o oxigénio para

formar outras espécies reactivas (Macmicking *et al.*, 1997). O óxido nítrico tem acção parácrina, ou seja, age em células próximas ao local da sua produção. As suas principais funções prendem-se com o relaxamento do endotélio (vasodilatação) e a destruição de microorganismos (Wiese, 2008). Quando existe em grandes quantidades assume propriedades pró-oxidantes, de apoptose e regulação dos efeitos das citocinas (Napoli *et al.*, 2010).

1.1.5 - Factor activador de plaquetas (PAF)

O PAF é um fosfolípido ligado a um éter. É derivado dos fosfolípidos da membrana pela acção da fosfolipase A₂. O PAF pode ser produzido por diversos tipos celulares que participam na resposta inflamatória incluindo os mastócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Além de auxiliar na indução da agregação de plaquetas e libertação do conteúdo lisossomal no local lesado, o PAF eleva a libertação de serotonina pelas plaquetas. O PAF é um vasodilatador potente e também aumenta a permeabilidade vascular (Favacho, 2009; Trowbridge & Emling, 1997; White, 1999).

A acção do PAF nos fagócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos) é promover o metabolismo do ácido araquidónico, levando ao aumento da motilidade e a formação de radicais livres (Trowbridge & Emling, 1997).

1.1.6 - Eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos)

Uma das mais importantes classes de mediadores lipídicos são os eicosanóides. Os eicosanóides derivados do ácido araquidónico são hormonas locais potentes libertadas pelas células de modo a activarem-se a si mesmas (efeito autócrino) ou a activarem as células circundantes (efeito parácrino) (Phung, 2008). Estes sinais, rapidamente inactivados, são capazes de regular diversas respostas fisiológicas e processos patológicos. Sabe-se que os eicosanóides regulam processos imunopatológicos que vão desde respostas inflamatórias a remodelação de tecidos, cancro, asma, artrite reumatóide e doenças auto-imunes (Harizi *et al.*, 2008; Masresha *et al.*, 2012).

Os eicosanóides incluem as prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas. São moléculas de sinalização produzidas através de uma via oxidativa do

ácido araquidónico. A biossíntese dos eicosanóides (**Figura 3**) depende da disponibilidade de ácido araquidónico livre. Quando os tecidos são expostos a estímulos fisiológicos e patológicos, tais como factores de crescimento, hormonas ou citocinas, o ácido araquidónico é produzido a partir dos fosfolípidos membranares pela acção directa da enzima fosfolipase A₂ (Favacho, 2009; Harizi *et al.*, 2008). O ácido araquidónico pode ser metabolizado através de enzimas por duas vias principais: cicloxigenases (COXs) e lipoxigenases (LOXs) (Favacho, 2009; Harizi *et al.*, 2008; Phung, 2008).

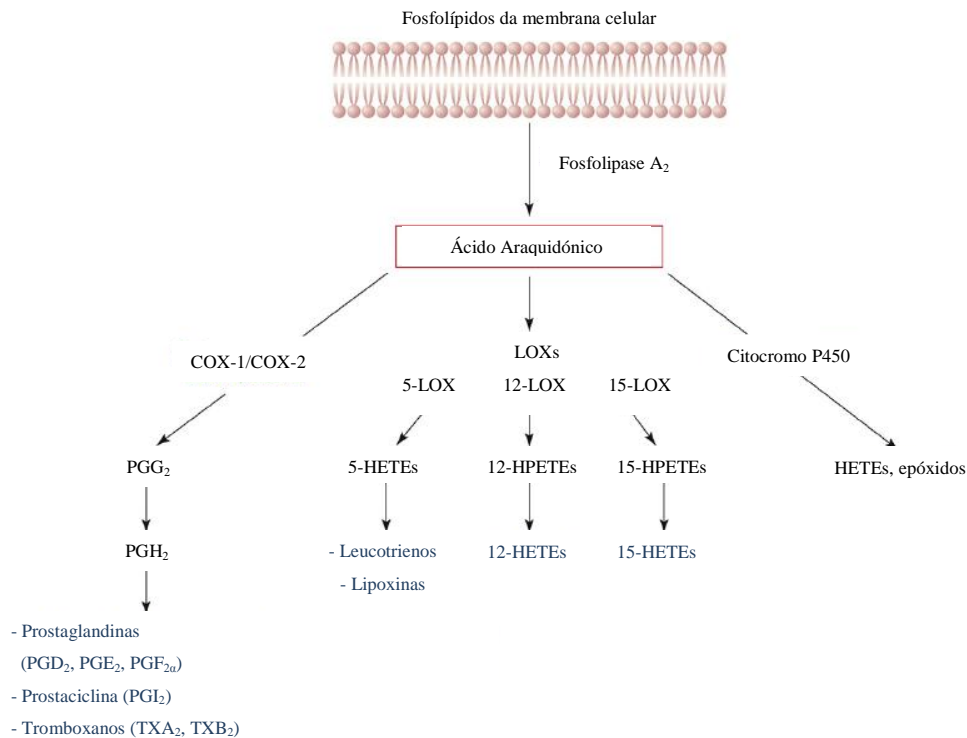


Figura 3 - Biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidónico. COX - cicloxigenase; LOX - lipoxigenase; PG - prostaglandina; HPETE - ácidos hidroxiperoxieicosatetranóicos; HETE - ácidos hidroxieicosatetranóicos (adaptado de Harizi *et al.*, 2008).

Via da cicloxigenase (COX)

A prostaglandina endoperóxido sintase, coloquialmente designada cicloxigenase ou COX tem duas actividades catalíticas distintas (**Figura 4**): (1) de cicloxigenase que oxida o ácido araquidónico em Prostaglandina G₂ e (2) de peroxidase que reduz, subsequentemente, a prostaglandina G₂ a prostaglandina H₂. Posteriormente, a Prostaglandina H₂ instável é transformada em prostanóides por diversas sintetases de tecidos específicas e isomerases. Os prostanóides incluem as prostaglandinas (D₂, E₂ e F_{2α}), a prostaciclina (PGI₂) e o tromboxano A₂ (Charlier & Michaux, 2003).

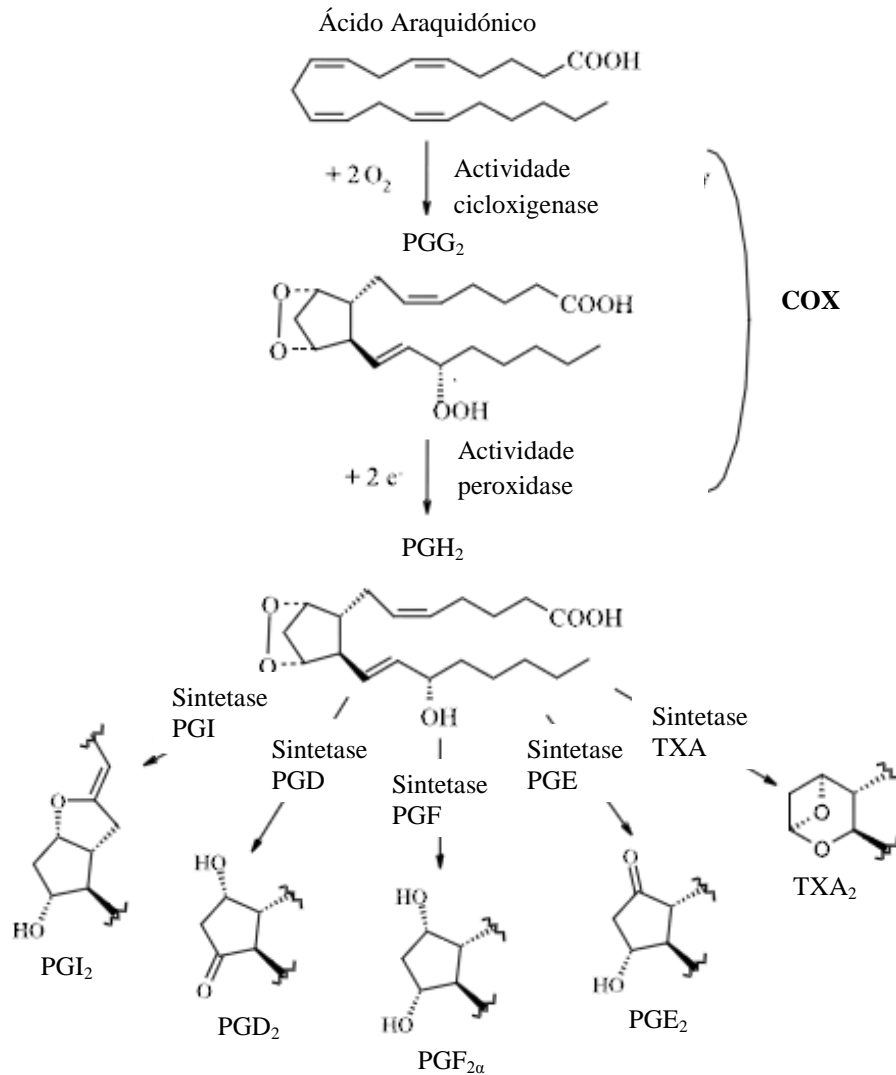


Figura 4 - Via da cicloxigenase. PG - Prostaglandina; PGI₂ - Prostaciclina; TXA₂ - Tromboxano A₂ (adaptado de Charlier & Michaux, 2003).

Existem duas isoformas de COX, COX-1 e COX-2, cada uma possuindo propriedades catalíticas, reguladoras e de distribuição nos tecidos específicas da sua isoforma (Phung, 2008). A COX-1 é expressa constitutivamente na maioria das células e é a fonte dominante da produção de prostanóides que são responsáveis por funções homeostáticas e de protecção do epitélio gástrico. A COX-2, induzida por estímulos inflamatórios, hormonas e factores de crescimento, é a fonte mais importante da formação de prostanóides na inflamação e em patologias de proliferação como o cancro (Dubois *et al.*, 1998; Ricciotti & FitzGerald, 2011).

A PGI₂ é produzida pelas duas isoformas da COX e é um substrato comum para uma série de isomerases específicas e sintetases que produzem as prostaglandinas D₂, E₂, F_{2α}, PGI₂ e tromboxano A₂. O tipo de produção de prostanóides é determinado pela expressão diferencial destas enzimas nas células presentes no local da inflamação. Por

exemplo, os mastócitos produzem predominantemente prostaglandina D_2 , enquanto que os macrófagos produzem prostaglandina E_2 e tromboxano A_2 . Os prostanóides exercem os seus efeitos biológicos pela ligação a receptores de superfície celular específicos. Existem, pelo menos, nove receptores conhecidos de prostanóides: os receptores da prostaglandina D_2 , DP_1 e DP_2 , os receptores da prostaglandina E_2 , EP_1 , EP_2 , EP_3 e EP_4 ; o receptor da prostaglandina $F_{2\alpha}$, FP ; o receptor da PGI_2 , IP ; e o receptor do tromboxano A_2 , TP . Todos estes pertencem à super-família de receptores acoplados à proteína G (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

Uma vez que possuem funções autócrinas e parácrinas, estes lípidos bioactivos podem designar-se como hormonas locais. De facto, quando um prostanóide é produzido, sai da célula e interage, posteriormente, com os receptores acoplados à proteína G, seja na célula parental ou nas células circundantes para modelar os níveis dos mensageiros secundários (Charlier & Michaux, 2003). Não são armazenados mas são sintetizados “de novo” pelas células activadas (Phung, 2008).

Uma das prostaglandinas mais abundantemente produzidas no organismo é a prostaglandina E_2 . Está envolvida em todos os processos clássicos da inflamação, é um importante mediador de muitas funções biológicas como a regulação de respostas imunes, pressão arterial, integridade gastro-intestinal e fertilidade. Durante a inflamação, o rubor e a formação de edema resultam de um aumento do fluxo sanguíneo no tecido inflamado através de um incremento da dilatação arterial e permeabilidade vascular mediados pela prostaglandina E_2 . A dor resulta da acção da prostaglandina E_2 nos neurónios sensoriais periféricos e na espinal medula (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

A PGI_2 apresenta propriedades anti-coagulantes (Charlier & Michaux, 2003) e é a prostaglandina mais importante na regulação da homeostase cardiovascular. A principal fonte de PGI_2 são as células vasculares, incluindo as células endoteliais. Uma vez gerada, a PGI_2 é libertada de modo a agir nas células vasculares do músculo liso (VSMCs) vizinhas, assim como as plaquetas circulantes. De facto, exerce os seus efeitos localmente, não sendo armazenada, e é rapidamente convertida por processos não enzimáticos a um produto de hidrólise inactivo (Ricciotti & FitzGerald, 2011). A PGI_2 é um potente vasodilatador e inibidor da agregação das plaquetas, adesão de leucócitos e proliferação das VSMCs (Noda *et al.*, 2007; Ricciotti & FitzGerald, 2011). Para além dos efeitos no sistema cardiovascular, a PGI_2 é um importante mediador do edema e da dor que estão presentes na inflamação aguda (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

A prostaglandina D_2 possui diversas actividades biológicas, incluindo vasodilatação, constrição brônquica e inibição da agregação das plaquetas (Yamamoto *et al.*, 2011). É sintetizada no sistema nervoso central e nos tecidos periféricos. No cérebro, está envolvida na regulação do sono e outras actividades do sistema nervoso central, incluindo a percepção da dor. Nos tecidos periféricos, a prostaglandina D_2 é produzida, essencialmente, por mastócitos mas também por outros leucócitos. Nos mastócitos, inicia as respostas alérgicas agudas do tipo 1 mediadas por IgE (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

A prostaglandina $F_{2\alpha}$ é sintetizada a partir da prostaglandina H_2 através da sintase PGF e actua pelo seu receptor FP, que é acoplado à proteína G de modo a elevar a concentração intracelular de cálcio livre. A prostaglandina $F_{2\alpha}$ derivada principalmente da COX-1 no aparelho reprodutor feminino, tem um papel importante na ovulação, luteólise, contracção do músculo liso do útero, e início de parto. Parece desempenhar um papel fundamental nas funções renais, contracção das artérias, disfunção do miocárdio, lesões cerebrais e dor (Ricciotti & FitzGerald, 2011).

O tromboxano A_2 é um metabolito instável do ácido araquidónico com uma meia-vida de cerca de 30 segundos, sendo sintetizado a partir da prostaglandina H_2 através da enzima sintase TXA_2 . É degradado em tromboxano B_2 , biologicamente inactivo. O tromboxano A_2 é derivado predominantemente da COX-1 das plaquetas, mas também pode ser produzido por outros tipos celulares, incluindo a COX-2 dos macrófagos (Ricciotti & FitzGerald, 2011). O tromboxano possui esta designação por causa do seu papel na formação de coágulos. É um importante indutor da agregação das plaquetas e constrictor do músculo liso vascular e respiratório. Já foi identificado como mediador em diversos processos patológicos como em trombooses, aterosclerose e isquémia do miocárdio (Phung, 2008).

Via da lipoxigenase (LOX)

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas solúveis localizadas no citosol e encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos (Favacho, 2009). São enzimas que catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos gordos a partir de ácidos gordos polinsaturados (Kusmartsev, 2012). Tal como as enzimas COX, participam no metabolismo do ácido araquidónico. Estas podem ser classificadas em 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX e 15-LOX de acordo com a posição da oxigenação no ácido araquidónico

(Walther *et al.*, 1999). Os mediadores químicos produzidos incluem os ácidos hidroxiperoxieicosatetranóicos (HPETE), ácidos hidroxieicosatetranóicos (HETE) e leucotrienos. Os leucotrienos mais investigados são os produzidos pela 5-LOX presente nas células inflamatórias como os neutrófilos PMNs, basófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos (Frum, 2006).

A enzima 15-LOX está envolvida em muitos processos patológicos. Verificou-se num estudo que a 15-LOX possui um papel importante na progressão da artrite reumatóide e pode estar envolvida na acção inflamatória induzida por TNF- α e IL-1 β (Wu *et al.*, 2012). No sistema cardiovascular, as enzimas 12/15-LOX induzem a inflamação que está envolvida na insuficiência cardíaca. A expressão elevada destas enzimas promove a infiltração de macrófagos no coração, causando, então, fibrose cardíaca e disfunção sistólica (Kayama *et al.*, 2009).

Uma das principais funções da enzima 15-LOX é no aparecimento da aterosclerose. A aterosclerose é uma doença complexa que envolve a inflamação crónica em todos os estágios desde a formação da placa aterosclerótica até à sua eventual ruptura. Os macrófagos derivados das células espumosas assumem papéis importantes na aterosclerose, regulando as respostas pró-inflamatórias derivadas de lípidos que promovem a aterosclerose. Um grupo de macrófagos acumula-se nas placas ateroscleróticas e produz citocinas pró-inflamatórias, assim como lipoxigenases que convertem ácidos gordos polinsaturados a mediadores pró-inflamatórios. A 15-LOX catalisa a produção de eicosanóides que activam as integrinas dos monócitos e, portanto, promovem a adesão dos monócitos ao endotélio (Magnusson *et al.*, 2012; Walther *et al.*, 1999). Além disso, a 15-LOX promove ainda o aparecimento de asma e doença pulmonar obstrutiva crónica (Feltenmark *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

1.2 - Anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)

Os AINEs constituem uma importante classe de fármacos com aplicações terapêuticas há muitas décadas. O tratamento de patologias inflamatórias como a artrite reumatóide e a asma com a aspirina e outros anti-inflamatórios tradicionais até aos recentes inibidores selectivos de COX-2 forneceram uma base científica fundamental na descoberta de novos fármacos.

As vias da COX e LOX assumem relevância clínica, pois através da inibição destas enzimas é possível evitar a formação de moléculas pró-inflamatórias.

Os AINEs têm como alvo as enzimas COX. À excepção da aspirina, os AINEs actuam como inibidores reversíveis e competitivos da COX. Estes fármacos podem ser divididos em duas classes: 1) AINEs tradicionais, não específicos para as duas isoformas de COX e 2) inibidores selectivos de COX-2 (Charlier & Michaux, 2003).

1.2.1 - Inibidores não selectivos de COX

Os AINEs tradicionais como o ácido acetilsalicílico, o ibuprofeno e o diclofenac que exibem inibição não selectiva de COX, representam alguns dos fármacos anti-inflamatórios mais prescritos para aliviar a febre, dor e inflamação (Rao *et al.*, 2010). Apesar destes inibidores serem muito diferentes em termos de composição química, todos eles possuem um grupo carboxílico (COOH). Estes inibidores partilham as mesmas propriedades terapêuticas mas também são responsáveis por lesões gastro-intestinais (Charlier & Michaux, 2003). A inibição preferencial pela enzima COX-1 nos AINEs é responsável por estes efeitos tóxicos intestinais. Nos locais lesados, os AINEs tradicionais reduzem a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (via inibição da COX-2) mas também a formação de prostaglandinas fisiológicas (via inibição da COX-1) (Charlier & Michaux, 2003; Jäggi *et al.*, 2004).

O ácido acetilsalicílico foi introduzido no mercado pela Bayer em 1899. Contudo, o mecanismo de acção de agentes anti-inflamatórios como a aspirina e indometacina só passou a ser conhecido na década de 1970 a partir dos estudos de John Vane (Rao & Knaus, 2008). Vane verificou que este mecanismo tinha por base a inibição da síntese de PGs e hoje já existe uma aceitação geral desta teoria. A inibição causada pela aspirina deve-se à acetilação irreversível do sítio activo da COX, não afectando a actividade de peroxidase da enzima. Ao contrário desta acção de irreversibilidade da aspirina, outros AINEs como o ibuprofeno ou a indometacina inibem a COX de forma reversível pela competição com o substrato ácido araquidónico pelo sítio activo da enzima (Botting, 2006).

No início da década de 1990, o grupo de Needleman, Simmons e Herschman referiu a presença de uma isoforma induzível da enzima COX, mais tarde identificada como COX-2. Esta descoberta levou à hipótese de que as prostaglandinas fisiológicas

eram produzidas através da expressão constitutiva de COX-1, enquanto que as PGs pró-inflamatórias eram produzidas via indução da isoforma COX-2 (Rao & Knaus, 2008). Uma vez que já se tinha conhecimento de que os AINEs tradicionais inibiam as duas isoformas de COX e que, portanto, os seus efeitos adversos advinham da inibição da produção das PGs fisiológicas através da via de COX-1, em 1999 Searle e Pfizer lançaram no mercado o primeiro inibidor selectivo de COX-2, *celecoxib*, de modo a contornar estes efeitos (Dugowson & Gnanashanmugam, 2006; Rao & Knaus, 2008).

1.2.2 - Inibidores selectivos de COX-2

Os inibidores selectivos de COX-2 foram introduzidos em 1999, e os primeiros a serem introduzidos foram o *celecoxib* e *rofecoxib*. A principal característica estrutural destes inibidores é a ausência do grupo carboxílico que existe nos AINEs tradicionais. Possuem um grupo sulfonamida ou metilsulfona (Botting, 2006; Charlier & Michaux, 2003). Os dados experimentais e estudos clínicos indicam que os inibidores selectivos de COX-2 são agentes anti-inflamatórios eficazes acompanhados de um risco reduzido de toxicidade intestinal quando comparados com os AINEs tradicionais (Charlier & Michaux, 2003).

Recentes estudos farmacológicos têm levantado duas questões fundamentais, nomeadamente se as prostaglandinas responsáveis pela integridade da mucosa gástrica e pelas funções renais são produzidas somente via COX-1 enquanto as prostaglandinas pró-inflamatórias são produzidas somente via COX-2. Já se verificou, contudo, que a COX-2 é expressa constitutivamente no rim e no tracto reprodutor. No sistema reprodutor, tem um papel importante na ovulação e esta enzima também é expressa no epitélio do útero nos diferentes estágios da gravidez (Charlier & Michaux, 2003). No rim, assume funções na regulação da perfusão e libertação de renina em condições normais ou patológicas. Estudos recentes sugerem que o bloqueio selectivo de COX-2 levam a um aumento de tromboxano A₂ que aumenta a proteinúria, filtração glomerular e patologia renal (Charlier & Michaux, 2003; Gambaro, 2002). Alguns estudos também já demonstraram que os inibidores selectivos de COX-2 podem alterar o equilíbrio entre o tromboxano A₂ (pró-trombótico) e PGI₂ (anti-trombótico), levando a uma possibilidade de complicações cardiovasculares (Rao & Knaus, 2008). É este equilíbrio que mantém o fluxo sanguíneo normal e regula as respostas de coagulação nas lesões.

Quando a COX-2 é inibida, as plaquetas produzem tromboxano A₂ através da COX-1, que é a única isoforma da COX disponível (Gambaro, 2002). Em Abril de 2005, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos concluiu que os inibidores selectivos de COX-2 aumentam o risco de consequências cardiovasculares. A FDA recomendou que a venda de *valdecoxib* fosse suspensa pois causa o aparecimento de erupções cutâneas graves assim como a possibilidade de enfartes do miocárdio. O *celecoxib* mantém-se no mercado, mas com a indicação de risco de complicações cardiovasculares (Rao & Knaus, 2008).

Em conclusão, parece que os inibidores selectivos de COX-2 não são os agentes anti-inflamatórios mais seguros.

1.2.3 - Inibidores de COX/LOX: o futuro da terapia anti-inflamatória?

Os AINEs tradicionais e os inibidores selectivos de COX-2 exercem primariamente a sua actividade pela redução das prostaglandinas induzidas nos processos inflamatórios. No entanto, já foi demonstrado que a inibição da COX causada pelos AINEs, além de causar uma redução das prostaglandinas vasodilatadoras e gastro-protectoras levam a uma regulação do metabolismo do ácido araquidónico pela via da 5-LOX, causando um aumento da formação de leucotrienos e contribuindo para os efeitos adversos observados nos AINEs (Charlier & Michaux, 2003; Martel-Pelletier, 2003).

Já foram sintetizados diversos agentes inibidores duplos de COX e LOX. Alguns foram descontinuados (*tebufelone* e *tepoxalin*) devido à toxicidade apresentada no fígado causada pela inibição ampla de enzimas redox (Gambaro, 2002). Por seu turno, o *licofelone* é um dos compostos mais promissores nesta categoria e é o primeiro a ter ultrapassado a fase III dos ensaios clínicos para o tratamento da dor e inflamação associados à osteoartrite (Drug Development Technology, 2004; Gambaro, 2002).

No entanto, um fármaco que tenha uma actividade de inibição dupla de COX/LOX não é suficientemente flexível para conseguir uma inibição óptima das duas enzimas. Ou seja, a dose usada para inibir a COX dificilmente é a mesma para inibir a LOX. Uma abordagem mais promissora e exequível é a utilização de dois fármacos diferentes que possuam, respectivamente, actividades anti-COX e anti-LOX pronunciadas. Portanto, obtém-se um melhor resultado terapêutico pela variação das

doses de ambos os fármacos adequado a determinada patologia ou condição (Butovich & Lukyanova, 2008).

Após exploração da literatura relativamente aos diversos fármacos anti-inflamatórios não esteróides, é possível constatar que os AINEs actualmente utilizados não são a melhor resposta no combate à resposta inflamatória. Uma estratégia possível será encontrar um fármaco que consiga inibir simultaneamente a enzima COX-2 e as LOXs, tendo em conta que é preciso investigar a dose necessária para direccionar a via do ácido araquidónico no sentido pretendido.

2 - Actividade anti-inflamatória na medicina popular

2.1 - Plantas medicinais com actividade anti-inflamatória

Os fármacos anti-inflamatórios não esteróides são dos mais utilizados no tratamento de diversas doenças inflamatórias. No entanto, os efeitos secundários que advêm do uso prolongado representam um grande problema no seu uso clínico (Martel-Pelletier *et al.*, 2003). Desde a Antiguidade que as plantas têm sido utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias e de outras patologias relacionadas (Agnihotri *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2010). Com o surgimento da medicina moderna, houve necessidade de investigar os constituintes activos presentes nestas plantas. Já foram identificadas, isoladas e testadas várias moléculas relativamente às suas actividades farmacológicas. As moléculas activas existentes nas plantas forneceram as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de moléculas sintéticas mais eficazes (Agnihotri *et al.*, 2010). A maior parte dos metabolitos secundários derivados das plantas interferem directa ou indirectamente com as seguintes moléculas e/ou mecanismos: mediadores inflamatórios (metabolitos do ácido araquidónico, aminas vasoactivas, péptidos, PAF, etc.), a produção e/ou acção de mensageiros secundários (como GMPc, AMPc, proteínas cinases, e cálcio, entre outros), a expressão de factores de transcrição e a expressão de moléculas pró-inflamatórias como a sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), COX, neuropéptidos e proteases (Calixto *et al.*, 2003).

Algumas das plantas medicinais comumente utilizadas no tratamento da inflamação incluem: *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae), *Arnica montana* L.

(Asteraceae), *Salix alba* (Salicaceae), *Glycyrrhiza glabra* (Fabaceae) (Shah *et al.*, 2011), *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), *Ananas comosus* (Zingiberaceae) e *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) (Calixto *et al.*, 2003; Shah *et al.*, 2011). A actividade anti-inflamatória demonstrada pelas plantas deve-se uma variedade de metabolitos secundários, tais como polifenóis, saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides, triterpenos e alcalóides (Kumar *et al.*, 2009; Saeed *et al.*, 2010). Seguidamente, serão explorados alguns dos grupos de metabolitos secundários responsáveis pela actividade anti-inflamatória, com base na literatura.

2.2 - Metabolitos secundários

2.2.1 - Polifenóis

Os polifenóis podem ser definidos como compostos que possuem na sua estrutura ciclos aromáticos ligados a um ou mais grupos hidroxilo, sem serem azotados. Derivam, principalmente, do metabolismo do ácido xiquímico e/ou de um poliactetato (Cunha & Roque, 2005a).

O resveratrol (**Figura 5**) é um polifenol presente em muitas plantas, nomeadamente na casca da uva e, conseqüentemente, no vinho tinto. Sabe-se que este composto possui diversas acções biológicas, entre as quais se insere a acção anti-

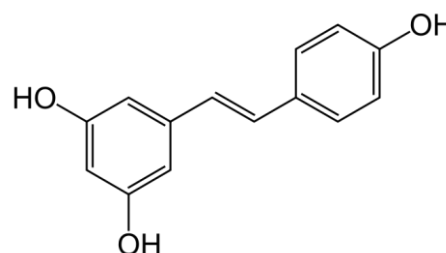


Figura 5 - Resveratrol

inflamatória. Este composto inibe as enzimas COX-1 e COX-2 e a formação de prostanóides pela via da LOX. Apesar de não se conhecer bem o mecanismo específico sob o qual o resveratrol actua, certo é que tem efeitos favoráveis no tratamento de doenças cardiovasculares e do cancro (Calixto *et al.*, 2003).

2.2.2 - Saponinas

As saponinas são integrantes de famílias de compostos relacionadas que contêm um grupo esteróide ou aglicona triterpenóide (sapogenina) ligado por uma ligação glicosídica a misturas de oligossacáridos (**Figura 6**). A presença de grupos polares (oligossacáridos) e apolares (esteróide e triterpenóide) proporcionam propriedades de

interacção química responsáveis por muitos dos efeitos favoráveis e secundários das saponinas, em particular as propriedades anfipáticas que deram origem ao seu nome. A principal característica das saponinas é a interacção com os componentes membranares e celulares. As saponinas promovem a hemólise através de interacções não específicas com as proteínas membranares, os fosfolípidos e o colesterol da membrana dos eritrócitos (Makkar *et al.*, 2007).

Por exemplo, já foram detectadas saponinas triterpenóides em *Polygala japonica* Hout (Polygalaceae) que se verificou inibirem a formação de edema. As folhas e a casca de *Thespesia populnea* Soland ex Correa (Malvaceae) são usadas para produzir um óleo utilizado como medicamento popular no tratamento de feridas. O extracto etanólico desta planta, contendo saponinas na sua composição, demonstrou actividade anti-inflamatória em modelos de inflamação aguda e crónica (Agnihotri *et al.*, 2010).

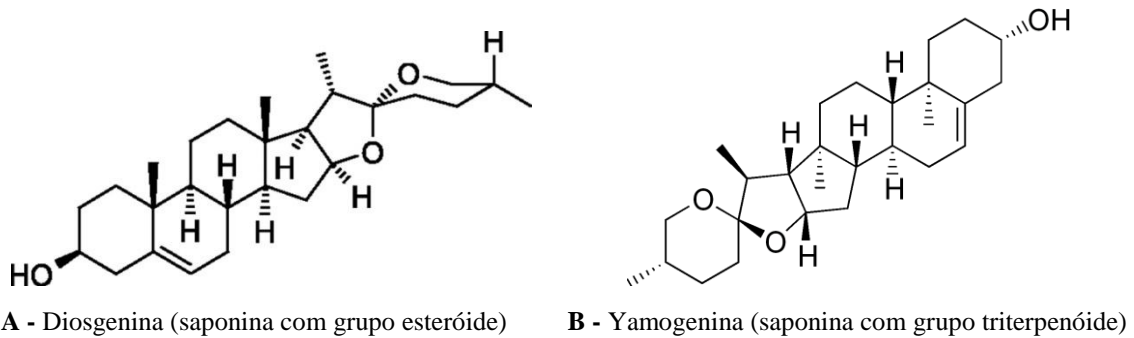


Figura 6 - Estrutura de saponinas esteróides (A) e triterpenóides (B).

2.2.3 - Flavonóides

O grupo dos flavonóides tem por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzopirona) (Figura 7). Os flavonóides podem ocorrer na forma genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados (Campos, 2005).

Os flavonóides encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal e já foi demonstrado

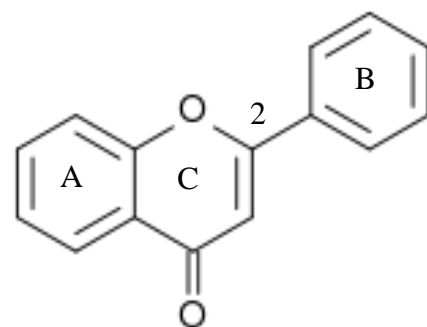


Figura 7 - 2-fenil-benzopirona.

que possuem propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. O flavonoide baicaleína, (Figura 8A) isolado da raiz de *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), inibe selectivamente a 5-LOX e a produção de leucotrieno C₄ em macrófagos de rato. A sua

aplicação oral atenua os sintomas inflamatórios de colite, tais como os níveis baixos de hemoglobina no sangue e o sangramento do recto (Calixto *et al.*, 2003).

O cirsilicol (**Figura 8B**), um flavonóide isolado de *Achillea fragrantissima* Forssk. (Asteraceae), é um potente inibidor da 5-LOX ($IC_{50} = 0,1 \mu\text{M}$) nos basófilos de rato com leucemia. Outros flavonóides derivados de plantas, incluindo a luteolina (**Figura 8C**) e a morina (**Figura 8D**) inibiram, de forma moderada, a actividade da COX-2 na medula renal de rato (Calixto *et al.*, 2003). Já foi provado também que uma série de flavonóides inibiram a actividade da enzima 15-LOX sendo que o mais potente foi a luteolina com um IC_{50} de $0,6 \mu\text{M}$, seguido da baicaleína ($1 \mu\text{M}$) e da fisetina ($1,5 \mu\text{M}$) (Sadik *et al.*, 2003).

A partir dos estudos realizados até agora, foi possível concluir que os flavonóides são os principais agentes anti-inflamatórios de entre as diversas famílias de compostos com actividade anti-inflamatória. Alguns deles actuam como inibidores da fosfolipase A_2 , outros como inibidores do TNF- α em diferentes condições inflamatórias. Investigações bioquímicas também já mostraram que os flavonóides podem inibir as vias da COX e da LOX na cascata do ácido araquidónico, dependendo da sua estrutura química. A título de exemplo, a quercetina (**Figura 8E**), um flavonóide com actividade anti-inflamatória já largamente estudado, não apresenta efeitos secundários em humanos (Agnihotri *et al.*, 2010).

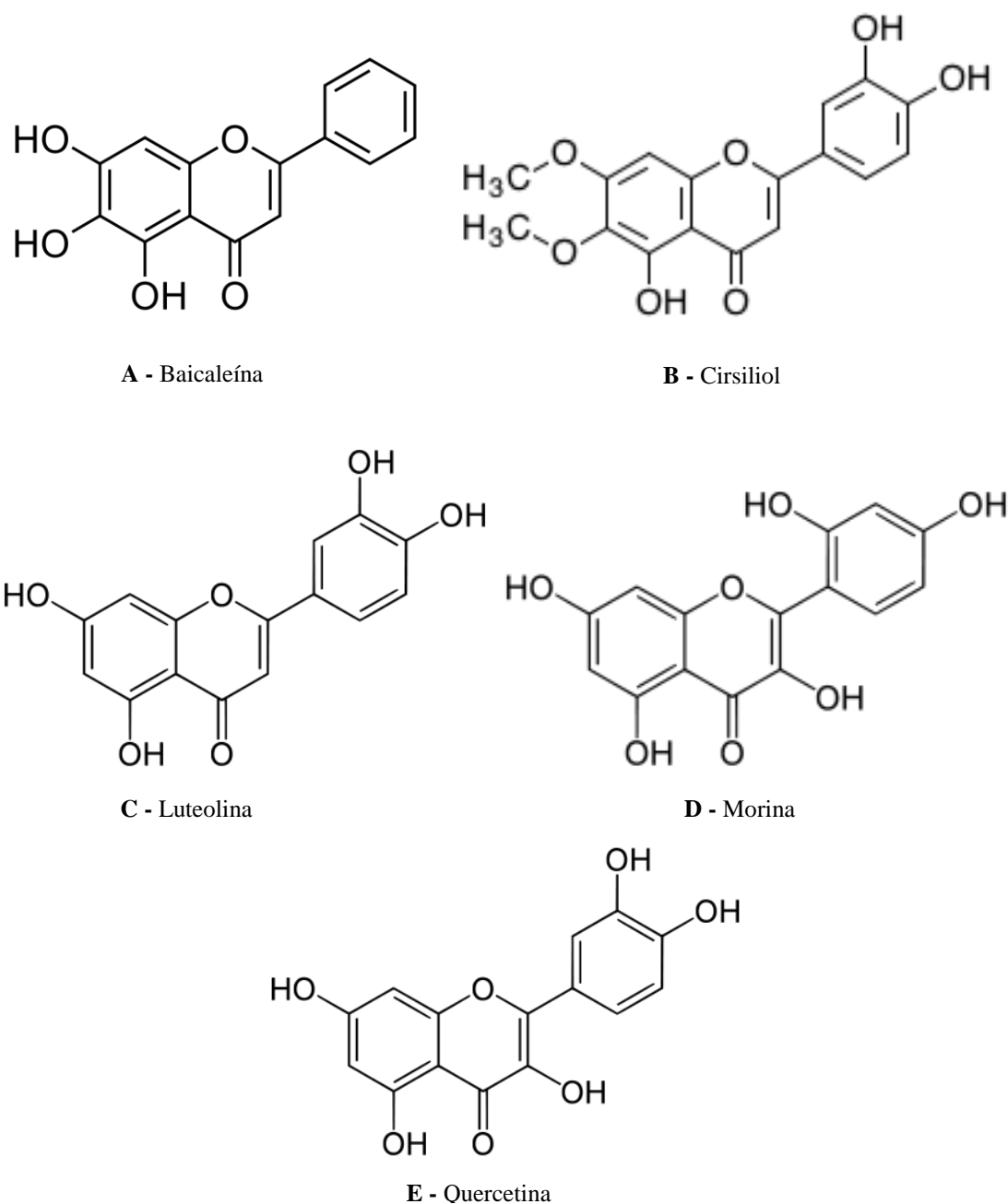


Figura 8 - Flavonóides isolados de plantas.

2.2.4 - Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são uma classe de compostos que contêm um ou mais anéis aromáticos com, pelo menos, um grupo hidroxilo e um grupo ácido carboxílico na sua estrutura. Estão divididos em dois grupos, os ácidos benzóicos que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono, predominantemente na forma hidroxilada (C_6-C_3) (Cunha & Roque, 2005b).

O ácido cafeico é um dos principais metabolitos produzidos a partir da hidrólise do ácido clorogénico, composto fenólico presente em vários alimentos, incluindo o café. Foi verificado num estudo, que o éster fenetil do ácido cafeico (**Figura 9**) inibiu a expressão de COX-2 e, conseqüentemente, a produção de PGE₂ em células da pele de rato (Kang *et al.*, 2009). Além disso, também já foi verificado que inibe a actividade da COX-1 e COX-2 (IC₅₀ de 58 e 82 µM, respectivamente) (Calixto *et al.*, 2003).

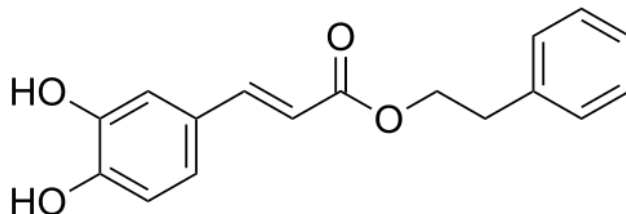


Figura 9 - Éster fenetil do ácido cafeico.

2.2.5 - Triterpenos e Esteróides

Os triterpenos formam-se a partir do esqualeno, um hidrocarboneto com 30 átomos de carbono e podem ser tetracíclicos ou pentacíclicos. Estes podem estar ligados a oses, originando heterósidos como acontece com os saponósidos (Cunha & Roque, 2005c).

Os triterpenos pentacíclicos constituem uma classe de substâncias que ocorrem e se encontram amplamente distribuídas nas plantas e possuem diversas acções biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, como confirmado com estudos *in vitro* e *in vivo*. A aplicação tópica do triterpeno pentacíclico lupeol (**Figura 10A**) inibiu a formação de edema e a actividade da mieloperoxidase no rato. A resina de *Boswellia serrata* Roxb. (Burseraceae) é benéfica no tratamento de pacientes com inflamação crónica. Os seus efeitos devem-se, em parte, à presença do triterpeno pentacíclico ácido boswéllico (**Figura 10B**). Este composto inibe parcialmente a actividade da 5-LOX de forma selectiva nos leucócitos PMNs (Calixto *et al.*, 2003). *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae) tem acção antiulcerosa devido ao efeito anti-inflamatório atribuído à glicirrizina e à glicerretina, saponósidos triterpénicos (Cunha *et al.*, 2006).

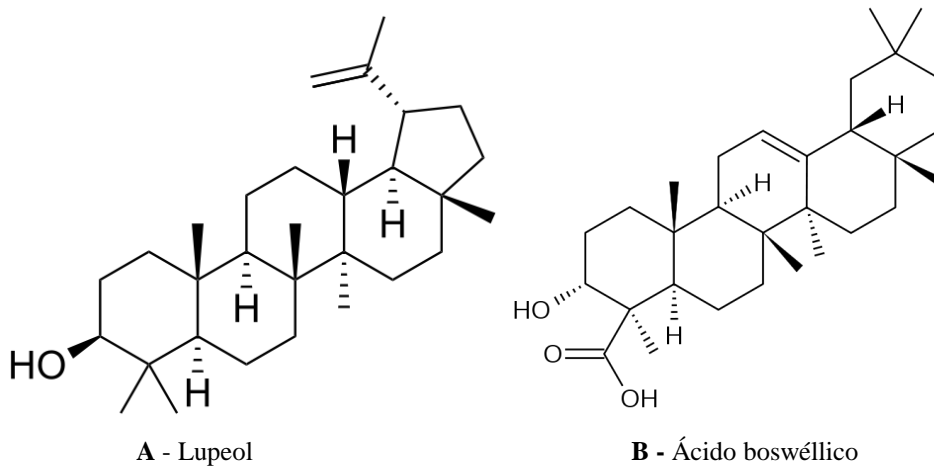


Figura 10 - Triterpenos isolados de plantas.

Os esteróides são compostos orgânicos que possuem na sua estrutura base quatro anéis de cicloalcano ligados entre si. Os grupos metilo, normalmente, estão presentes na posição C-10 e C-13. Também poderá estar presente uma cadeia lateral de alquilo na posição C-17 (Moss, 1989).

Em *Clavularia viridis* Quoy & Gaim (Clavularidae), foram isolados quatro novos esteróides (Figura 11) que se verificou reduzirem os níveis de expressão da proteína iNOS quando comparado com o controlo (Agnihotri *et al.*, 2010).

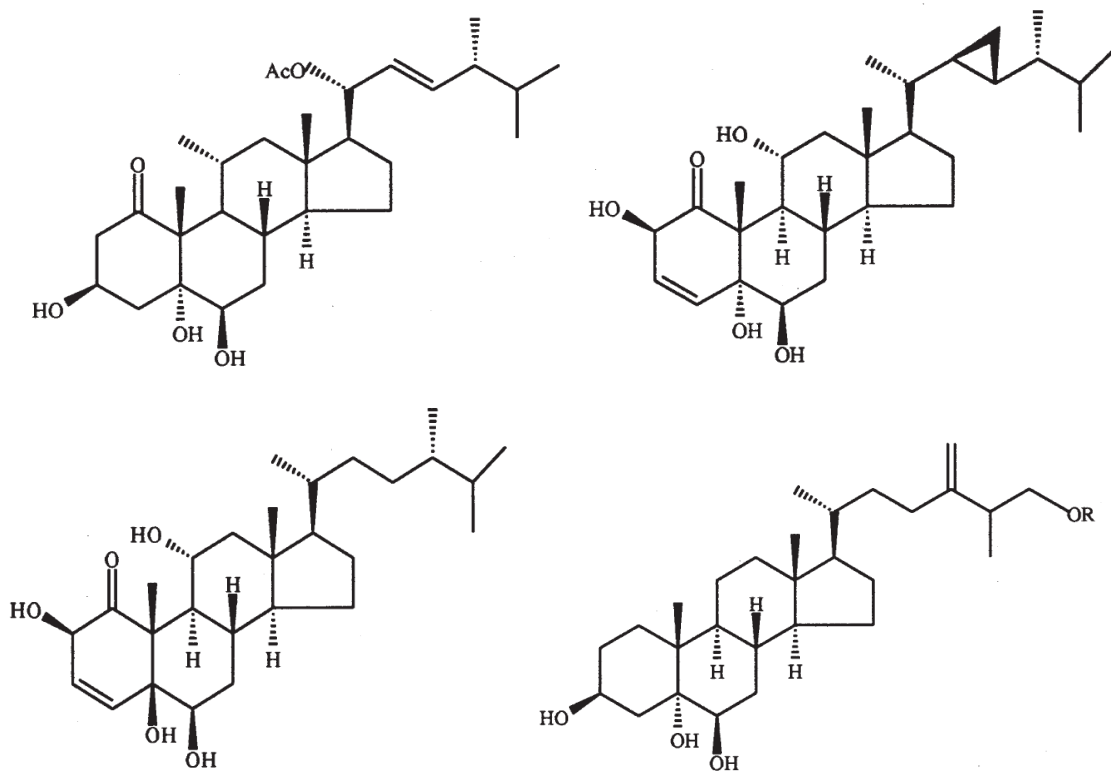


Figura 11 - Esteróides isolados de *Clavularia viridis* Quoy & Gaim (Clavularidae).

2.2.6 - Alcalóides

Os alcalóides contêm um ou mais átomos de azoto, em combinação com um sistema cíclico. Os alcalóides são um grupo heterogéneo, em termos químicos. Não são nem aminoácidos, nem nucleótidos, nem cofactores. Contrariamente a estas últimas famílias de compostos, que são metabolitos primários, os alcalóides estão normalmente limitados ao reino das plantas superiores (Cunha *et al.*, 2005; Lobo & Lourenço, 2007).

Os alcalóides com um anel de piridina na sua estrutura apresentam actividade anti-inflamatória muito elevada como é o exemplo da berberina (**Figura 12**) de *Berberis spp.* que é usada como medicamento tradicional para o reumatismo (Agnihotri *et al.*, 2010).

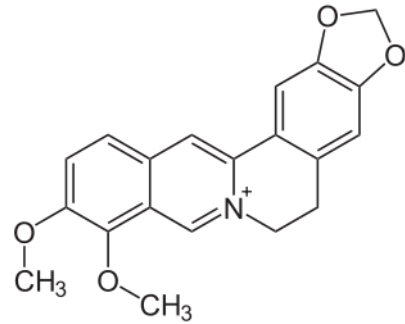


Figura 12 - Berberina.

Alchornea cordifolia (Schum. & Thonn.) Muell.-Arg. (Euphorbiaceae) tem sido usada no tratamento de patologias como a dermatite, asma, hepatite e colite. Foram isolados desta planta os alcalóides diisopentenil guanidina e triisopentenil guanidina que demonstraram elevada actividade anti-inflamatória (Agnihotri *et al.*, 2010). A achiranthina de *Achyranthes aspera* L. demonstrou actividade anti-inflamatória e anti-artrítica em ratos (Singh *et al.*, 2008).

3 - Espécies vegetais estudadas

3.1 - *Ilex perado* Aiton *ssp.* *azorica* (Loes.) Tutin (azevinho) (Aquifoliaceae)

O azevinho recebeu o seu nome científico *Ilex perado* Aiton (**Figura 13**) em 1789, numa publicação feita por William Aiton, director do jardim botânico de Kew localizado em Londres. Foi Francis Masson que recolheu para este jardim diversas espécies da Madeira, Canárias e Açores, de entre as quais se encontrava *I. perado*, (Fernandes, 1947). A classificação botânica de *I. perado* é a seguinte:

Divisão: Spermatophyta

Subdivisão: Magnoliophytina

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Cornales

Família: Aquifoliaceae

Género: *Ilex*

Nome da espécie: *Ilex perado* Aiton subsp. *azorica* (Loes.) Tutin

O azevinho é um arbusto ou pequena árvore de folhas persistentes, escuras e brilhantes, lisas elípticas a oblongas, com pontas aguçadas de cor verde-escuro. As flores são brancas-rosadas e os frutos têm uma cor vermelho-vivo. A Madeira e as Canárias têm igualmente as suas sub-espécies.



Figura 13 - *Ilex perado* Aiton (foto de: Paulo Henrique Silva)

Normalmente encontrada acima dos 500 metros de altitude, é um importante membro da floresta laurisilva; pode ser vista como espécimes isolados ou em barreiras. Esta espécie endémica (Schafer, 2005) existe em todas as ilhas dos Açores à excepção da Graciosa e encontra-se ameaçada de extinção nas ilhas de Santa Maria e Corvo (Pontes & Braga, 2006; Sayers, 2010). Não foi ainda publicado nenhum estudo farmacológico ou fitoquímico sobre esta espécie.

Ilex paraguariensis A. St. Hil., espécie do mesmo género de *I. perado* e usada no tratamento de inflamações na América do Sul, possui xantinas (cafeína, teobromina e vestígios de teofilina), flavonóides, taninos, ácido clorogénico e os seus derivados e numerosas saponinas triterpénicas derivadas do ácido ursólico (matesaponinas – **Figura 15**), na sua constituição (Bracesco *et al.*, 2011; Heck & Mejia, 2007). Os níveis de polifenóis nos seus extractos são superiores aos do chá verde e semelhantes aos do vinho tinto (Bracesco *et al.*, 2011).

Num estudo realizado por Puangraphant e Mejia (2009), constatou-se que, de entre os extractos brutos de *I. paraguariensis* e os seus componentes isolados, o composto com maior poder inibidor na via NO/iNOS foi a quercetina ao bloquear a enzima COX-2. No entanto, a combinação da quercetina com as matesaponinas resultou

numa interacção sinérgica de inibição do óxido nítrico e da produção da prostaglandina E₂, evidenciando, também, acção anti-inflamatória (Bracesco *et al.*, 2011; Puangpraphant & Mejia, 2009).

A raiz seca de *Ilex pubescens* Hook. et Arn. é comumente utilizada no tratamento de doenças cardiovasculares e inflamações na medicina tradicional da China. A fracção pura de saponinas desta planta foi administrada em ratos com reacção inflamatória aguda. Foi observado que esta fracção suprimiu de forma significativa a formação de edemas e que os mecanismos moleculares por trás desta actividade foram a inibição da expressão de COX-2, da produção de citocinas, e a diminuição dos níveis de IL-1 β , IL-6, e TNF- α nos ratos com edemas (Wang *et al.*, 2008).

3.2 - *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy (coucelos) (Crassulaceae)

U. rupestris (Figura 14), de nome comum coucelos nos Açores, foi reclassificada em 1948 por James Edgar Dandy. Tem como classificação botânica a seguinte:

Divisão: Spermatophyta

Subdivisão: Magnoliophytina

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Saxifragales

Família: Crassulaceae

Género: *Umbilicus*

Nome da espécie: *Umbilicus rupestris* (Salisb.) Dandy

A família Crassulaceae é constituída por 35 géneros e 1500 espécies na qual se insere *Umbilicus rupestris*, de nome comum coucelos ou umbigo-de-vénus, planta com pecíolo longo, folhas carnudas, redondas, deprimidas no centro, formando um “umbigo”. As flores são brancas ou vermelhas em espiga longa, geralmente



Figura 14 - *Umbilicus* spp. (foto de: Autor)

pendentes e a raiz é grossa, em tubérculo. A floração ocorre de Abril a Junho. É muito comum encontrá-la disseminada por buracos nas paredes de pedra e sobre telhados (Corsépius, 1997; Schäfer, 2005). Encontra-se distribuída por todas as ilhas do arquipélago (Borges *et al.*, 2005).

Nos Açores, os coucelos são usados na medicina popular, nomeadamente as folhas frescas que são indicadas e utilizadas como emolientes (calos e calosidades) (Corsépius, 1997). As folhas são aplicadas sobre feridas “para tirar a inflamação” (Braga & Pontes, 2005). No entanto, ainda não foi publicado nenhum estudo farmacológico sobre esta espécie.

Em termos de análise fitoquímica, já foram isolados e caracterizados alguns metabolitos secundários dentro do género. Um dos compostos isolados foi o Z-venuzol, um glicósido fenilpropanóide. Em *U. rupestris*, já foram isolados três fenilpropanóides e O-glucosilflavonol das suas folhas (Viornerly *et al.*, 2000).

Sedum sarmentosum Bunge, pertencente à mesma família de *U. rupestris*, é usada tradicionalmente no tratamento de certas patologias inflamatórias. Foram purificados seis glicósidos a partir da planta total, nomeadamente os sedumósidos E1, E2, E3, F1, F2 e G (Agnihotri *et al.*, 2010).

Da família Crassulaceae, *Cotyledon orbiculata* é usada no tratamento de várias doenças em diferentes zonas da África do Sul. O suco das folhas é utilizado em gotas nas dores de ouvido e nas dores de dentes e como compressas quentes em furúnculos e inflamações. Num estudo realizado por Amabeoku e Kabatende (2012), verificou-se que o extracto metanólico de *C. orbiculata* atenuou o edema de rato induzido por carragenina o que pode sugerir que a planta exerce o seu efeito anti-inflamatório pela inibição de uma série de mediadores inflamatórios. As folhas desta planta contêm taninos, saponinas e esteróides triterpénicos. Pensa-se que as saponinas podem ter contribuído para a actividade anti-inflamatória observada neste estudo (Amabeoku & Kabatende, 2012).

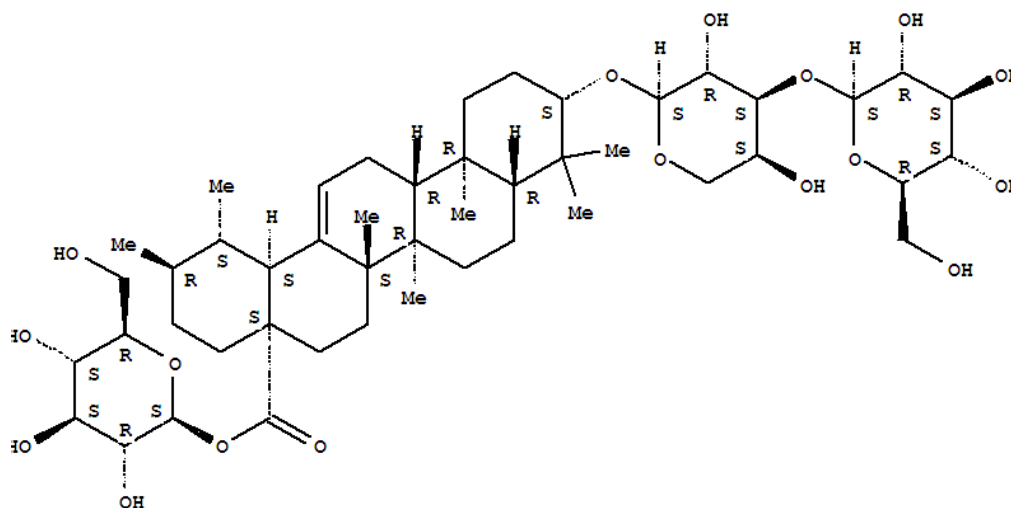


Figura 15 - Estrutura de uma macesaponina.

II – Material e Métodos

1 - Material vegetal

Foram colectadas para o estudo *Umbilicus rupestris* e *Ilex perado* na Ilha de São Miguel em Outubro de 2011, sendo a primeira recolhida no Pico de Salomão e a última nas Lombadas.

Recolheram-se folhas maduras, uma vez que é o reportado na literatura para o tratamento de inflamações (Corsépius, 1997).

Seguidamente às recolhas, as folhas maduras foram cuidadosamente limpas e eliminadas as que possuíam sinais de deterioração, armazenando-as a -80°C de modo a facilitar a posterior extracção pelo rebentamento da parede celular devido à formação de cristais de gelo.

2 - Preparação dos extractos

2.1- Extractos brutos

A aplicação das plantas medicinais em meios rurais é efectuada, geralmente, de modo directo sem mais processos de extracção, utilizando-se solventes aquosos na preparação de infusões. Para a realização de testes biológicos *in vitro*, decidiu utilizar-se solventes voláteis com polaridade semelhante à da água (acetona e etanol), de forma a facilitar o processo de extracção.

As folhas frescas foram trituradas com um homogenizador de lâminas e extraídas sequencialmente, numa primeira etapa, com acetona e numa segunda com etanol. Primeiramente, adicionou-se acetona ao material vegetal num balão de 5.00 L, deixando-se em constante agitação durante 48 horas à temperatura ambiente, numa proporção de aproximadamente 1 g material vegetal/4 mL de solvente, repetindo-se este processo por mais uma vez. Após evaporação completa da acetona no balão, o mesmo material vegetal foi extraído com etanol pelo mesmo processo que o realizado para o extracto de acetona. Após filtração, os extractos foram evaporados até à secura, sob vácuo, a uma temperatura de 40°C num evaporador rotativo, *Buchi Rotavapor R210*. Posteriormente, os extractos foram liofilizados durante 48 h de modo a eliminar a água residual. Os extractos foram armazenados à temperatura ambiente e protegidos da luz até ao momento dos ensaios.

2.2 - Fraccionamento dos extractos brutos nas fracções de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etilo

O extracto de acetona seco (61,89 g) foi submetido a extracção líquido-líquido. Foram utilizados os seguintes solventes de modo sequencial: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etilo e água (do mais apolar ao mais polar). O extracto seco foi, primeiramente, dissolvido em água destilada (≈ 1 L). Depois da sua completa dissolução, misturou-se com 0,80 L do primeiro solvente, hexano. O processo foi repetido por mais três vezes. Para os restantes solventes, realizou-se o mesmo procedimento. A separação das diversas fracções foi efectuada numa ampola de decantação de 5 L. As fracções obtidas foram, posteriormente, evaporadas à secura no evaporador rotativo, sob vácuo, a uma temperatura de 40°C. Da fracção de hexano resultou 6,40 g, de diclorometano 8,31 g, de clorofórmio 2,72 g e de acetato de etilo 3,85 g de peso seco. A **Figura 16** esquematiza as fracções obtidas.

O fraccionamento do extracto de etanol de *I. perado* realizou-se do mesmo modo que para o extracto de acetona. Obteve-se 9,04 g de extracto seco ao qual se efectuou extracção líquido-líquido. O extracto seco foi, primeiramente, dissolvido em água destilada ($\approx 0,30$ L). Depois da sua completa dissolução, misturou-se com 0,15 L do primeiro solvente, hexano. O processo foi repetido por mais três vezes. Para os restantes solventes (diclorometano, clorofórmio e acetato de etilo), realizou-se o mesmo procedimento. A separação das diversas fracções foi efectuada numa ampola de decantação de 0,50 L. As fracções obtidas foram, posteriormente, evaporadas à secura, de acordo como descrito anteriormente. Da fracção de hexano resultou 0,81 g, de diclorometano 1,38 g, de clorofórmio 0,03 g e de acetato de etilo 0,30 g de peso seco. O esquema das fracções obtidas encontra-se apresentado na **Figura 17**.

Para fraccionar os extractos de *U. rupestris*, utilizou-se o mesmo procedimento que para o fraccionamento de *I. perado*.

Sendo assim, do extracto seco de acetona (6,69 g peso seco) obteve-se 3,77 g da fracção de hexano, 0,05 g da fracção de diclorometano, 0,01 g da fracção de clorofórmio e e 0,27 g da fracção de acetato de etilo. A **Figura 18** apresenta, em forma de esquema, as fracções obtidas.

O extracto seco de etanol (2,90 g peso seco) foi fraccionado em 0,20 g da fracção de hexano, 0,01 g da fracção de diclorometano e 0,27 g da fracção de acetato de etilo. Não foi possível obter a fracção de clorofórmio a partir deste extracto. O esquema das fracções obtidas de *U. rupestris* encontra-se apresentado na **Figura 19**.

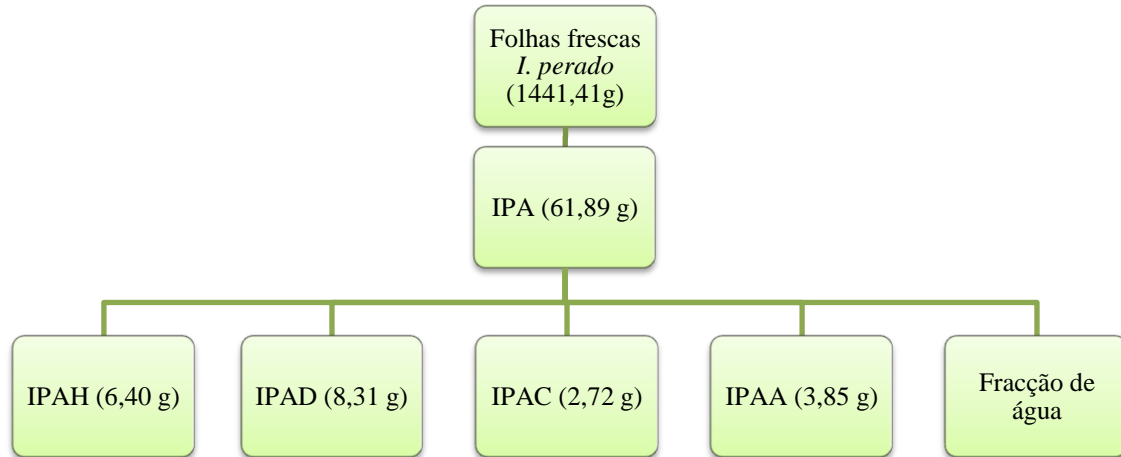


Figura 16 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de acetona de *I. perado*. **IP** - *Ilex perado*; **IPA** - extracto de acetona; **IPAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **IPAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **IPAC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **IPAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona.

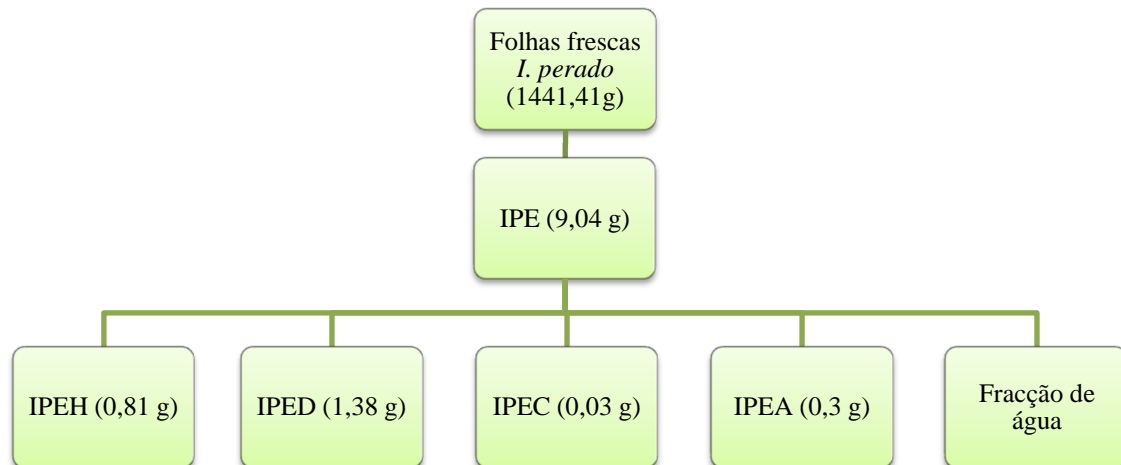


Figura 17 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de etanol de *I. perado*. **IP** - *Ilex perado*; **IPE** - extracto de etanol; **IPEH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **IPED** - fracção de diclorometano do extracto de etanol; **IPEC** - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; **IPEA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol.

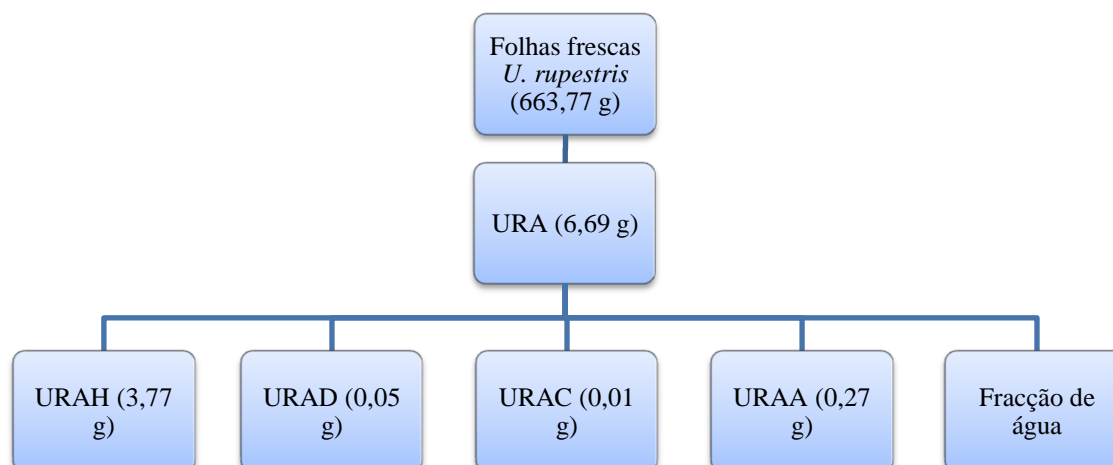


Figura 18 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de acetona de *U. rupestris*. **UR** - *Umbilicus rupestris*; **URA** - extracto de acetona; **URAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **URAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **URAC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **URAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona.

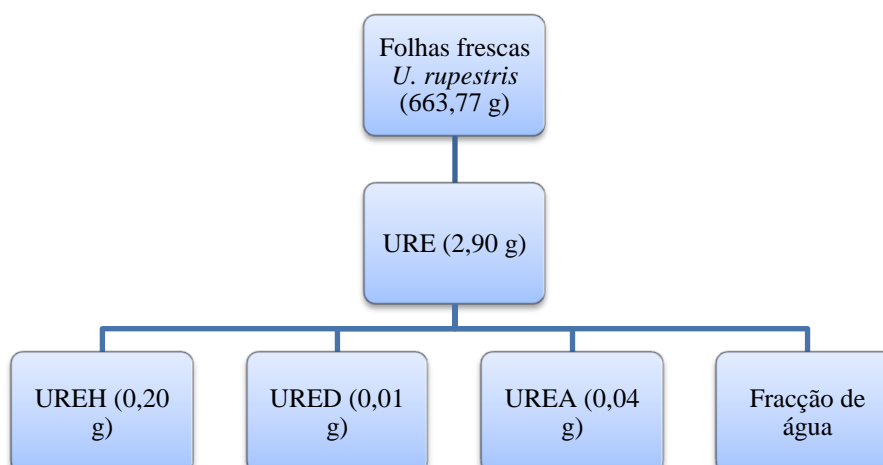


Figura 19 - Rendimentos da extracção e fraccionamento do extracto bruto de etanol de *U. rupestris*. **UR** - *Umbilicus rupestris*; **URE** - extracto de etanol; **UREH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **URED** - fracção de diclorometano do extracto de etanol; **UREA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol.

2.3 - Fraccionamento cromatográfico das fracções

As fracções obtidas que tiveram maior actividade nos ensaios anti-inflamatórios de *screening* foram submetidas a um sub-fraccionamento por cromatografia preparativa em camada fina (TLC). A monitorização do fraccionamento foi efectuada utilizando placas de alumínio, revestidas com sílica gel 60 F 254 (Merck). As placas foram observadas à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. Para se obter o melhor sistema de eluição possível, eluiu-se com diferentes fases móveis e diferentes proporções de solventes.

2.3.1 - *Ilex perado*

Fracção de clorofórmio do extracto bruto de acetona. A mistura inicial testada foi a de hexano e acetato de etilo nas seguintes proporções: 7:1; 1:1; 1:2; 1:4 e 1:7. Uma vez que não estava a ser possível a visualização de manchas individuais nas placas, eluiu-se com uma mistura de diclorometano e acetato de etilo na proporção 1:7. Novamente, não se conseguiu visualizar manchas individuais e alguma amostra ainda se encontrava no ponto de aplicação. Por esta razão, aumentou-se a polaridade da fase móvel. Portanto, a fracção de clorofórmio foi submetida a 100% de acetato de etilo numa primeira eluição e 100% de etanol na segunda eluição (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de clorofórmio do extracto bruto de acetona de *I. perado*.

Sub-Fracções	Eluente (1 ^a eluição/2 ^a eluição)	Massa (g)	Rendimento (%)
IP 1.3.1	100% EtOAc/100% EtOH	0,09	3,27
IP 1.3.2	100% EtOAc/100% EtOH	0,02	0,78
IP 1.3.3	100% EtOAc/100% EtOH	0,18	6,71

Fracção de hexano do extracto bruto de etanol. A fracção de hexano foi submetida, primeiramente, a uma mistura de hexano e acetato de etilo nas seguintes proporções: 8:2 e 1:1. As manchas individuais observadas correspondiam a clorofilas detectadas pela sua fluorescência a vermelho no comprimento de onda 366 nm. Portanto, alterou-se o sistema de eluição para uma mistura de diclorometano e acetato de etilo. Uma vez que as manchas já apareciam destacadas umas das outras, submeteu-se a fracção de hexano a uma mistura de diclorometano e acetato de etilo (9 DCM:1 EtOAc) na primeira eluição e na segunda eluição com 100% de acetato de etilo (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de hexano do extracto bruto de etanol de *I. perado*.

Sub-Fracções	Eluente (1 ^a eluição/2 ^a eluição)	Massa (g)	Rendimento (%)
IP 2.1.1	9 DCM:1 EtOAc/100% EtOAc	0,13	16,0
IP 2.1.2	9 DCM:1 EtOAc/100% EtOAc	0,04	4,67
IP 2.1.3	9 DCM:1 EtOAc/100% EtOAc	0,13	16,0
IP 2.1.4	9 DCM:1 EtOAc/100% EtOAc	0,01	0,50

2.3.2 - *Umbilicus rupestris*

Fracção de hexano do extracto bruto de etanol. Inicialmente, eluiu-se com uma mistura de hexano e acetato de etilo nas proporções de 8:2, 1:1 e 1:2. O melhor sistema de eluição encontrado e que separava melhor as sub-fracções foi o de hexano e acetato de etilo (4 EtOAc:1 hexano) na primeira eluição e na segunda eluição com 100% de etanol (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Massa e rendimento das sub-fracções da fracção de hexano do extracto bruto de etanol de *U. rupestris*.

Sub-Fracções	Eluente (1 ^a eluição/2 ^a eluição)	Massa (g)	Rendimento (%)
UR 2.1.1	4 EtOAc:1 hexano/100% EtOH	0,13	65,5
UR 2.1.2	4 EtOAc:1 hexano/100% EtOH	0,01	6,6

3 - Análise fitoquímica

3.1 - Análise fitoquímica dos extractos e fracções de *I. perado* e *U. rupestris* em TLC

As análises fitoquímicas possibilitam a revelação qualitativa das diferentes classes de metabolitos secundários presentes nas várias fracções. A análise fitoquímica foi realizada para a detecção de polifenóis, saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides e alcalóides (Brossi, 1988; Govindappa *et al.*, 2011; Wagner & Bladt, 2001), como descrito pelos autores.

Para a detecção de polifenóis utilizou-se a fase móvel acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). Foi pulverizada uma mistura de 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% (m/v) e cloreto de ferro 2% (m/v) nas placas (Anexo I), as quais foram analisadas no visível. O aparecimento de manchas azuladas indicou a presença de polifenóis.

Para a detecção de saponinas utilizou-se como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1) e eluiu-se duas vezes. As saponinas foram visualizadas pela pulverização de ácido sulfúrico concentrado em etanol a 5% (v/v) e aquecimento das placas a 110 °C, durante

5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração roxo beringela, no visível, indicou a presença de saponinas.

Para a análise de flavonóides e ácidos fenólicos e utilizou-se a fase móvel acetato de etilo: hexano (7:1). Na placa de sílica, pulverizou-se o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A visualização das manchas efectuou-se à luz UV, a 366 nm. Os flavonóides apareciam como manchas verdes fluorescentes enquanto que os ácidos fenólicos surgiam como manchas azuis fluorescentes. A quercetina foi o padrão de referência para a detecção de flavonóides enquanto que o ácido salicílico serviu como padrão para a detecção de ácidos fenólicos.

Para a análise de esteróides utilizou-se como fase móvel hexano: acetato de etilo (8:2). O reagente de Liebermann-Burchard (Anexo I) foi pulverizado na placa e esta foi levada a aquecimento a 110°C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas no visível indicou a presença de esteróides. O colesterol foi usado como padrão de referência para esta detecção.

Para a detecção de alcalóides utilizou-se como fase móvel acetato de etilo: metanol: água (4:1:2). O reagente de Wagner (Anexo I) foi pulverizado na placa e o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, indicou a presença de alcalóides. A berberina foi usada como padrão de referência para esta detecção.

3.2 - Análise fitoquímica das sub-fracções de *I. perado* em HPLC

As análises foram realizadas pela Professora Doutora Helena Gaspar (Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) num HPLC *Dionex Ultimate 3000* com uma bomba quaternária e um detector DAD (*Diode Array Detector*). As sub-fracções de *I. perado* foram analisadas por terem apresentado maior actividade nos ensaios de inibição das enzimas COX e LOX. As amostras foram dissolvidas em metanol. Foi utilizada uma coluna *Phenomenex® hexafenil* (250 mm x 4,6 mm), um *loop* de 100 µL e um forno *Geoko 2000* acoplado para manter a temperatura a 30°C. As fases móveis utilizadas foram metanol (solvente A) e água com 0,1% de ácido trifluoroacético (solvente B) com um fluxo de 0,8

mL/min. O gradiente do método consistiu em inicialmente utilizar 35% de solvente A e 65% de solvente B, após 30 min, a fase móvel passou a ser 100% de solvente A e assim permaneceu durante 10 min. Passado o tempo referido, a fase móvel voltou para as condições iniciais em 5 min e assim permaneceu durante mais 5 min para estabilização do sistema. A quantidade de amostra injectada foi de 20 µL. O detector foi programado para verificar as absorvâncias em 4 comprimentos de onda: 210, 254, 280 e 305 nm. Os dados foram recolhidos e tratados com o *software* Chromeleon® Chromatography Data System.

De modo a determinar a que grupo de compostos pertenciam os compostos das sub-fracções, comparou-se os espectros de UV das sub-fracções com os de compostos puros: cafeína, teofilina, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido gálico e quercetina.

4 - Avaliação da actividade anti-inflamatória *in vitro*

De modo a investigar a possível actividade anti-inflamatória das plantas colectadas, procedeu-se à realização de ensaios de *screening*. O ensaio de inibição de desnaturação da albumina, teste de estabilidade da membrana e o ensaio de inibição da acção da protease tripsina foram escolhidos como os ensaios de *screening* preliminar para a posterior análise nos testes de inibição das enzimas LOX e COX.

4.1 - Inibição da desnaturação da albumina

Muitos métodos *in vitro*, cada qual baseado num mecanismo bioquímico específico, foram desenvolvidos para um *screening* inicial de actividade anti-inflamatória. Um destes métodos, considerando que alguns agentes anti-inflamatórios inibem a desnaturação de proteínas, baseia-se precisamente na protecção contra a desnaturação proteica (Bhaskar & Mohite, 2010).

A desnaturação proteica é simultaneamente causa e consequência da resposta inflamatória e da artrite reumatóide (Chopade *et al.*, 2012; Govindappa *et al.*, 2011; Leelaprakash & Dass, 2011; Sakat *et al.*, 2010). O ácido acetilsalicílico e outros fármacos anti-inflamatórios possuem a capacidade de inibir a desnaturação de proteínas (Sakat *et al.*, 2010).

Os extractos e fracções obtidos foram analisados pelo teste de inibição da desnaturação da albumina de acordo com o método descrito por Puglia *et al.* (2006) e Saso *et al.* (1999), com algumas modificações. O ensaio baseia-se na desnaturação proteica provocada pela temperatura elevada. As consequências da perda estrutural das proteínas desnaturadas resultam na diminuição da solubilidade em água. Estas características são avaliadas no espectrofotómetro a 595 nm. Quanto mais elevada for a absorvância, maior é o grau de desnaturação (Angelis & Tirapegui, 2007).

O ensaio iniciou-se com a dissolução do padrão (ácido acetilsalicílico-*Sigma Aldrich*), extractos e fracções numa quantidade mínima de dimetil formamida (DMF) e diluição posterior em 0,066 M tampão fosfato pH 5,3 a 25 °C, de modo a ficarem à concentração de 0,5 mg/mL. A concentração final de DMF em todas as soluções foi inferior a 2,5%. Misturou-se a amostra/padrão com 0,08% albumina de soro bovino (BSA - *Sigma Aldrich*) no mesmo tampão na proporção de 1:1. No caso do controlo negativo, só foi utilizado tampão e BSA. A absorvância a 595 nm foi lida no tempo 0, num espectrofotómetro *Shimadzu UV-160*. As amostras foram deixadas a incubar durante 15 minutos a 27 °C. A desnaturação foi induzida pela temperatura de reacção a 70 °C durante 5 minutos e leu-se novamente a absorvância a 595 nm. O protocolo detalhado pode ser encontrado no Anexo II. O procedimento foi realizado em triplicado para todas as amostras. A percentagem de inibição de desnaturação da albumina foi calculada como se segue:

$$\% \text{ inibição desnaturação de BSA} = \left[\frac{1 - (A_{x,70^{\circ}\text{C}} - A_{0,22^{\circ}\text{C}})}{(A_{0,70^{\circ}\text{C}} - A_{0,22^{\circ}\text{C}})} \right] \times 100$$

Em que $A_{x,70^{\circ}\text{C}}$ é a absorvância a 595 nm da solução de BSA aquecida na presença de amostra/padrão (X); $A_{0,22^{\circ}\text{C}}$ e $A_{0,70^{\circ}\text{C}}$ correspondem às absorvâncias do controlo negativo (solução com BSA) antes e após aquecimento, respectivamente.

4.2 - Teste de estabilidade da membrana

O estudo da estabilização da membrana dos eritrócitos tem sido utilizado como um método *in vitro* de análise da actividade anti-inflamatória uma vez que a membrana

dos eritrócitos é análoga à membrana lisossomal (Leelaprakash & Dass, 2011; Okoye & Osadebe, 2010). A estabilização da membrana dos eritrócitos implica que o extracto e/ou fracção pode também estabilizar a membrana lisossomal (Leelaprakash & Dass, 2011; Sakat *et al.*, 2010). Os fármacos anti-inflamatórios podem actuar pela estabilização da membrana lisossomal (Yoganandam *et al.*, 2010; Leelaprakash & Dass, 2011).

O ensaio de determinação da estabilidade da membrana foi realizado de acordo com o previamente descrito (Govindappa *et al.*, 2011; Shinde *et al.*, 1999), com pequenas modificações. Este ensaio baseia-se no efeito que a temperatura tem na membrana dos eritrócitos. Quando se aumenta a temperatura, a taxa de difusão para a célula aumenta devido ao movimento molecular, aumentando o grau de hemólise. Muitas moléculas necessitam de energia de activação para passarem através da bicamada lipídica pelo que a temperatura auxilia a difusão destas moléculas. Em termos espectrofotométricos, o que se observa é um aumento de absorvância a 560 nm nos casos em que ocorre hemólise devido à libertação de hemoglobina que fica suspensa no sobrenadante (Scott, 1993).

Preparação da suspensão de eritrócitos. Primeiramente, foi recolhido o sangue total de suíno, utilizando-se heparina como anti-coagulante. O sangue foi transferido para tubos de centrífuga. Os tubos foram centrifugados a 1000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi descartado de modo a ficar só com a porção de eritrócitos. A porção de eritrócitos foi lavada três vezes com solução salina normal (0,9 % m/v). Posteriormente, a porção de eritrócitos lavada foi diluída com solução salina normal de modo a ficar a 10% (v/v).

Avaliação da hemólise induzida por calor. A mistura de reacção (3 mL) consistia em 2 mL da amostra/padrão (0,05; 0,10 e 0,2 mg/mL) e 1 mL da suspensão de eritrócitos a 10%. O ácido acetilsalicílico (*Sigma Aldrich*) foi usado como padrão de referência. No tubo controlo, só se adicionou solução salina em vez da amostra/padrão. Todos os tubos de centrífuga com a reacção foram incubados num banho a 56 °C durante 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram arrefecidos com água tépida. A mistura de reacção foi centrifugada a 800 g durante 5 minutos e a absorvância do sobrenadante foi lida a 560 nm num espectrofotómetro *Shimadzu UV-160*. O protocolo detalhado pode ser consultado no Anexo III. O procedimento foi realizado em duplicado para todas as

amostras. A percentagem de estabilização da membrana ou inibição da hemólise foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ estabilização da membrana} = (100 - (\text{Abs}_A/\text{Abs}_C)) \times 100$$

Onde Abs_A corresponde à absorvância da amostra a 560 nm e Abs_C representa a absorvância do controlo a 560 nm.

4.3 - Inibição da acção da protease tripsina

Os neutrófilos transportam nos seus grânulos lisossomais muitas proteases de serina (Sakat *et al.*, 2011; Leelaprakash & Dass, 2011). Estas proteases são secretadas após activação extracelular ou pericelular. Em doenças inflamatórias agudas, a infiltração de neutrófilos é responsável por causar danos teciduais no local da inflamação. Os fármacos não esteróides actuam pela inibição das enzimas lisossomais ou pela estabilização da membrana lisossomal (Yoganandam *et al.*, 2010).

Como parte do estudo do mecanismo de actividade anti-inflamatória, foi avaliada a capacidade dos extractos e fracções inibirem a acção da tripsina, como modelo de uma protease de serina. Estas actividades foram comparadas com um reconhecido anti-inflamatório não esteróide (AINE), o ácido acetilsalicílico.

O teste foi realizado de acordo com o método modificado de Sakat *et al* (2010) e Govindappa *et al.* (2011), com algumas modificações. Este ensaio monitoriza o grau de hidrólise da caseína pela enzima tripsina. A hidrólise da caseína produz aminoácidos livres, no entanto, apenas três tipos de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) evidenciam absorvância no comprimento de onda UV. A absorvância da tirosina, triptofano e fenilalanina obtida após hidrólise da caseína representam o conteúdo total de aminoácidos livres da caseína hidrolisada (Zhang *et al.*, 2010). Quanto mais elevado for o valor de absorvância a 280 nm, maior é o grau de hidrólise e menor a percentagem de inibição da tripsina.

Primeiramente, preparou-se solução de tripsina (*Sigma Aldrich*) a 2 mg/mL. Misturou-se 1 mL de tampão 20 mM Tris HCl (pH 7,4) e 1 mL da amostra/padrão (ácido acetilsalicílico-*Sigma Aldrich*), dissolvidos numa quantidade mínima de DMF

(< 2,5%) e diluídos com tampão, a testar a diferentes concentrações (0,06 - 1 mg/mL). Adicionou-se 60 µL de tripsina à mistura de reacção de modo a que a concentração final de enzima nos tubos fosse 0,06 mg/mL e incubou-se a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente, adicionou-se 1 mL de 0,8% de caseína (m/v) (*Sigma Aldrich*) e incubou-se novamente a mistura durante 20 minutos, à mesma temperatura. Ao fim dos 20 minutos, adicionou-se 1 mL de ácido perclórico 70% de modo a parar a reacção. Centrifugou-se a suspensão turva durante 10 minutos a 13000 g e leu-se a absorvância do sobrenadante a 280 nm num espectrofotómetro *Shimadzu UV-160* contra o tampão que serviu como branco. O protocolo com mais detalhes pode ser encontrado no Anexo IV. O procedimento foi realizado em duplicado para todas as amostras. A actividade de inibição da tripsina foi avaliada através da determinação do IC₅₀ (mg/mL) de todas as amostras obtido pela interpolação da regressão linear Concentração VS Abs a 280 nm. A percentagem de inibição da protease foi calculada como se segue:

$$\% \text{ Inibição da protease} = (\text{Abs}_C - \text{Abs}_A / \text{Abs}_C) \times 100$$

Em que Abs_A representa a absorvância da amostra (amostra + enzima + caseína) a 280 nm e Abs_C corresponde à absorvância do controlo (enzima + caseína) a 280 nm.

4.4 - Ensaio de inibição das enzimas cicloxigenase 1 e 2

A inibição das cicloxigenases, COX-1 e COX-2, foi determinada com o kit *COX Inhibitor Screening Assay* da *Cayman Chemical Co.*, nº 560131, de acordo com o protocolo do fabricante.

A cicloxigenase catalisa o primeiro passo da conversão do ácido araquidónico a prostaglandina H₂. A prostaglandina F_{2α} é produzida a partir da prostaglandina H₂ pela redução com cloreto de estanho (II) e esta é medida pelo ensaio imuno-enzimático (EIA).

Resumidamente, o heme e as enzimas COX-1/COX-2 foram adicionados a tubos de ensaio contendo tampão de reacção da COX (0,1 M de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA e 2 mM de fenol). A mistura foi agitada no vortex e incubada com o inibidor em etanol (0,025 mg/mL) ou somente tampão de reacção/etanol (100% actividade da enzima) durante 10 minutos, a 37 °C. O controlo negativo da enzima foi

realizado com as COXs que foram inactivadas num banho em ebulição durante 3 min. A reacção da cicloxigenase foi desencadeada pela adição de ácido araquidónico a todos os tubos, incubando-se durante 2 minutos à mesma temperatura. De seguida, adicionou-se ácido clorídrico (HCl) 1 M para parar a reacção catalítica da enzima.

A redução da prostaglandina H_2 a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ocorreu pela adição de cloreto de estanho (II) saturado e incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente (1):



As prostaglandinas obtidas foram quantificadas através do ensaio EIA. Este ensaio baseia-se na competição entre as prostaglandinas e a acetilcolinesterase ligada à prostaglandina (designada *PG tracer*) para uma quantidade limitada de anticorpo específico de prostaglandina (**Figura 20**). A quantidade de *PG tracer* que é capaz de se ligar ao anticorpo de prostaglandina é inversamente proporcional à concentração de prostaglandinas nos poços, uma vez que a concentração de *PG tracer* se mantém constante, enquanto que a concentração de prostaglandinas varia. Este complexo anticorpo-prostaglandinas liga-se a um anticorpo anti-prostaglandina previamente ligado ao poço. A microplaca foi lavada com uma solução tampão e o reagente de *Ellman*, contendo o substrato da acetilcolinesterase, foi adicionado aos poços. A resultante coloração amarela desta reacção enzimática foi determinada espectrofotometricamente num leitor de microplacas *Biorad* modelo 680, a 415 nm. A intensidade desta cor é proporcional à quantidade de *PG tracer* ligado ao poço, que é inversamente proporcional à quantidade de prostaglandinas livres presentes no poço. A concentração de prostaglandinas foi determinada através de uma curva padrão utilizando um padrão de prostaglandina fornecido com o kit. Os ensaios de inibição foram realizados na presença das sub-frações ou da indometacina (*Sigma Aldrich*) que serviu como padrão de referência. A indometacina foi escolhida pois inibe as duas enzimas (COX-1 e COX-2). O valor de absorvância do branco foi subtraído ao valor da absorvância dos poços com 100% de actividade da enzima e dos poços com inibidores. O Anexo V apresenta este protocolo com mais detalhes. O ensaio foi realizado em duplicado para todas as amostras.

O efeito anti-inflamatório das amostras foi avaliado pelo cálculo da percentagem de inibição da produção de prostaglandinas segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição COX-1/COX-2} = \left[\frac{[\text{PGs}] \text{ A} - [\text{PGs}] \text{ B}}{[\text{PGs}] \text{ A}} \right] \times 100$$

Em que [PGs] A corresponde à concentração de prostaglandinas nos tubos de 100% de actividade da enzima COX e [PGs] B corresponde à concentração de prostaglandinas nos tubos da amostra.

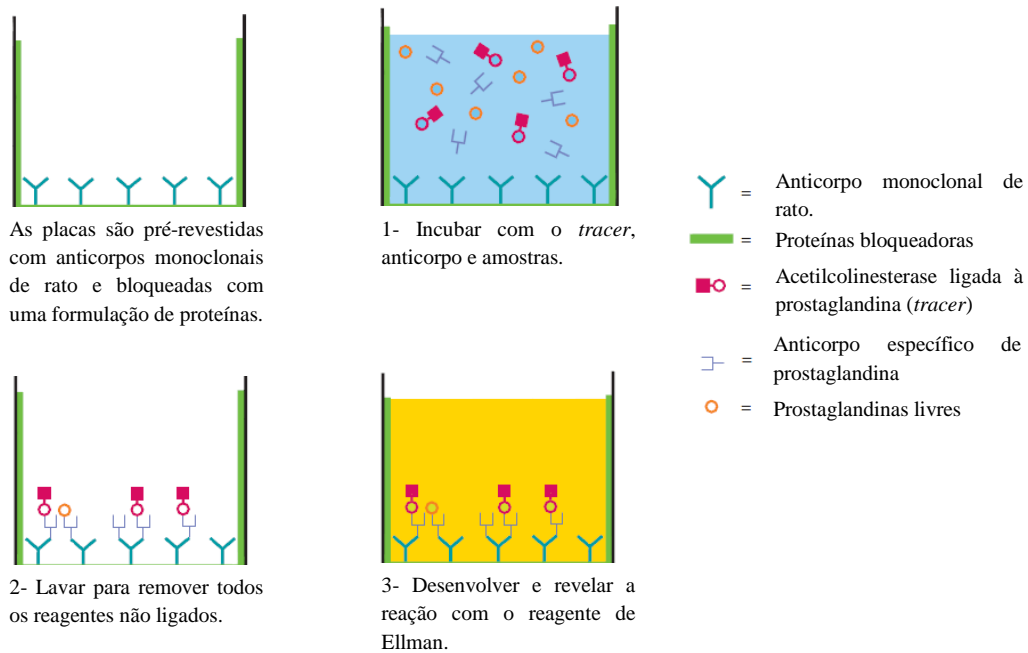


Figura 20 - Esquema do ensaio imuno-enzimático (Cayman Chemical Co., kit nº 560131).

4.5 - Ensaio de inibição da enzima 15-lipoxigenase

Os testes de inibição da lipoxigenase foram realizados com o kit *Lipoxigenase Inhibitor Screening Assay (LISA)* da Cayman Chemical Co., nº 760700, de acordo com o protocolo do fabricante.

As soluções fornecidas comercialmente com o kit LISA são 0,1 mol/L de tampão Tris-HCl (pH 7,4), cromógeno, enzima de soja padrão 15-LOX, ácido araquidónico e hidróxido de potássio (KOH). O tampão do ensaio foi diluído 10 vezes com água bi-destilada e filtrada antes de usar. O cromógeno, que deve ser usado dentro de uma hora, foi preparado juntando partes iguais dos agentes de revelação 1 e 2. O branco foi preparado pela adição de tampão do ensaio (100 µL) a dois poços da microplaca. Os poços para 100% de actividade da enzima foram preparados pela adição de 90 µL de 15-LOX e 10 µL de etanol (o mesmo solvente usado para dissolver os

inibidores). A fim de se testar a inibição da enzima, foi adicionado aos poços 15-LOX (90 µL) e a amostra/padrão (quercetina-*Sigma Aldrich*) (10 µL) a 0,025 mg/mL. A reacção foi iniciada pela adição de solução de substrato (10 µL). A microplaca foi coberta e colocada num agitador durante 5 min. O cromógeno (100 µL) foi adicionado a todos os poços de modo a parar a catálise da enzima e prevenir o desenvolvimento contínuo da reacção. O nível de hidroperóxidos produzidos pela 15-LOX a partir do ácido araquidónico foi quantificado a uma absorvância de 490 nm. O valor de absorvância do branco foi subtraído ao valor da absorvância dos poços com 100% de actividade da enzima e dos poços com inibidores. A absorvância foi lida num leitor de microplacas *Biorad* modelo 680. O protocolo mais detalhado encontra-se no Anexo VI. O ensaio foi realizado em duplicado para todas as amostras e o efeito inibidor foi calculado como se segue:

$$\% \text{ inibição 15-LOX} = \left[\frac{A - B}{A} \right] \times 100$$

Em que A é a absorvância a 490 nm de 100% de actividade da enzima LOX e B corresponde à absorvância a 490 nm da amostra.

5 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± d.p (desvio padrão). A análise de variância foi determinada pelo teste ANOVA e as diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo teste de Tukey, a $P < 0,05$. As correlações significativas entre os ensaios foram obtidas pelo coeficiente de correlação de Pearson (r), a $P < 0,05$. O tratamento estatístico foi realizado com o *software* SPSS Statistics, versão 17.0.

III - Resultados

Como referido anteriormente, os extractos e fracções obtidos foram, inicialmente, submetidos a ensaios de *screening in vitro* baseados em mecanismos bioquímicos ou celulares indicadores de potencial actividade anti-inflamatória.

As sub-fracções com maior actividade nos ensaios de *screening* foram submetidas ao teste de inibição da cicloxigenase e ao teste de inibição da lipoxigenase, indicadores mais específicos da actividade anti-inflamatória.

1 - Efeito dos extractos e fracções na inibição da desnaturação da albumina

1.1 - Ilex perado

Numa primeira fase, pretendeu-se avaliar quais os extractos e/ou fracções com maior actividade de inibição da desnaturação da albumina. Sendo assim, determinou-se a percentagem de inibição para os extractos de acetona e etanol de *I. perado* e as fracções de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etilo provenientes do fraccionamento dos dois extractos. Testou-se todas as amostras à concentração de 0,50 mg/mL e comparou-se com um reconhecido anti-inflamatório não esteróide (AINE), o ácido acetilsalicílico (**Figura 21**).

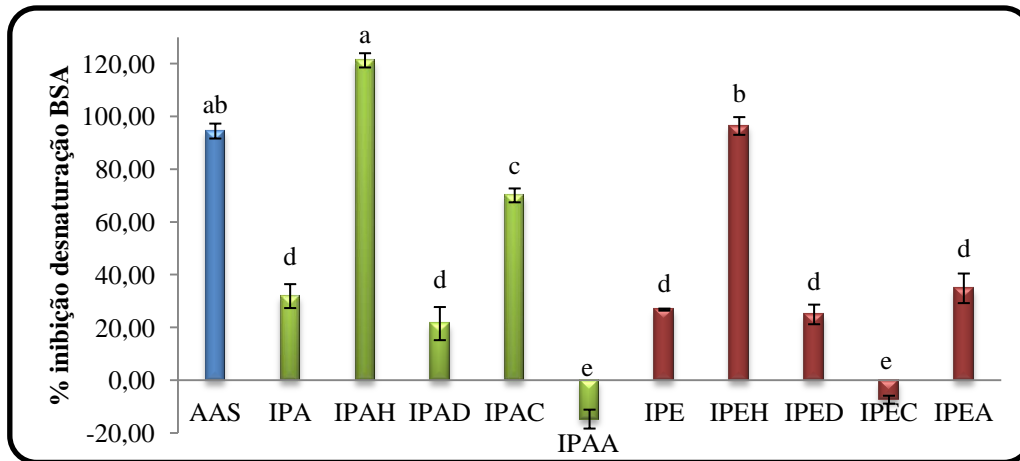


Figura 21 - Percentagens de inibição da desnaturação da albumina pelos extractos e fracções de *I. perado* e o padrão AAS à concentração de 0,50 mg/mL. **AAS** - Ácido Acetilsalicílico; **IPA** - extracto de acetona; **IPAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **IPAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **IPAC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **IPAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **IPE** - extracto de etanol; **IPEH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **IPED** - fracção de diclorometano do extracto de etanol; **IPEC** - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; **IPEA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol. Cada coluna corresponde à média de três ensaios. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Como é possível constatar pela análise da **Figura 1**, a fracção com maior actividade e até comparável à do padrão foi a IPAH, com uma percentagem de inibição de $121,3 \pm 2,70\%$ superior à do ácido acetilsalicílico com $94,7 \pm 2,83\%$. Contudo, não se observaram diferenças significativas entre estes grupos ($P = 0,101$). É também de salientar o poder inibidor da fracção IPEH com uma percentagem de inibição de $96,4 \pm 3,36\%$ e a fracção IPAC com uma percentagem de inibição de $70,1 \pm 2,63\%$. Em contrapartida, os extractos e as fracções IPA, IPAD, IPE, IPED e IPEA obtiveram pouca actividade com percentagens de inibição que variavam entre $21,5 \pm 6,28\%$ (IPAD) e $34,9 \pm 5,61\%$ (IPEA). As fracções IPAA e IPEC apresentaram um comportamento pró-inflamatório ao favorecerem a desnaturação da albumina com percentagens de inibição de $-14,7 \pm 3,6\%$ e $-7,3 \pm 1,50\%$, respectivamente. Pode ser referido, ainda, que algumas fracções provenientes dos extractos brutos IPA e IPE com pouca actividade obtiveram uma actividade anti-inflamatória mais elevada.

Através da análise dos resultados, é possível afirmar que as fracções mais activas neste ensaio são de natureza pouco polar ou apolar (IPAH e IPEH) e que o ácido acetilsalicílico, padrão utilizado no ensaio, possui dois grupos apolares na sua constituição (um grupo éster e um anel benzénico). O ácido acetilsalicílico e outros anti-inflamatórios comercializados como é o caso do diclofenac, ibuprofeno e indometacina possuem grupos apolares na sua estrutura, no entanto, todos estes têm um grupo

carboxílico (COOH) que é polar. Neste ensaio, parece que a maioria das moléculas responsáveis por inibir a desnaturação da albumina poderão ser apolares ou pouco polares.

1.2 - *Umbilicus rupestris*

Determinou-se, igualmente, a percentagem de inibição para os extractos de acetona e etanol de *U. rupestris* e as fracções de hexano, diclorometano e acetato de etilo provenientes do fraccionamento dos dois extractos. Novamente, testou-se todas as amostras à concentração de 0,50 mg/mL e comparou-se o ácido acetilsalicílico (**Figura 22**).

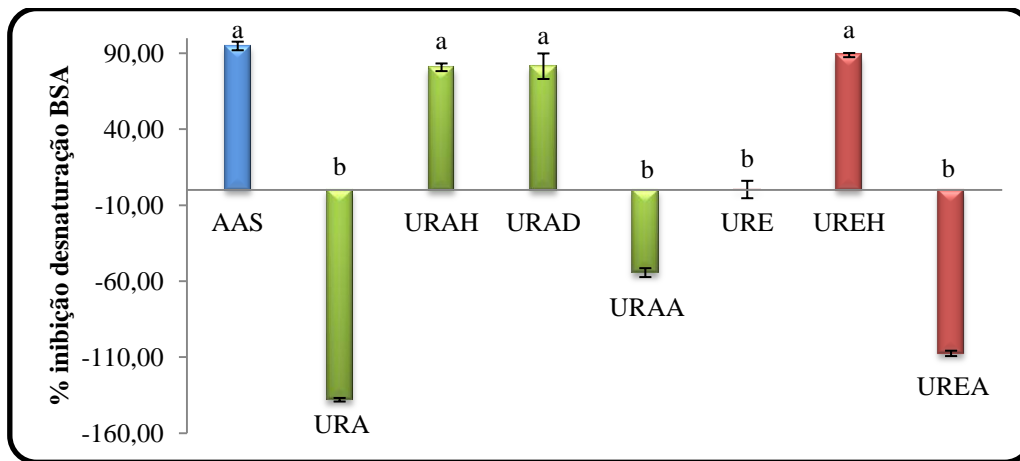


Figura 22 - Percentagens de inibição da desnaturação da albumina pelos extractos e fracções de *U. rupestris* e o padrão AAS à concentração de 0,50 mg/mL. **AAS** - Ácido Acetilsalicílico; **URA** - extracto de acetona; **URAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **URAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **URAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **URE** - extracto de etanol; **UREH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **UREA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol. Cada coluna corresponde à média de três ensaios. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Através da análise da **Figura 22**, pode concluir-se que as fracções mais activas, por ordem decrescente de actividade, foram a UREH apresentando inibição de $88,7 \pm 1,38\%$, a URAD com $81,4 \pm 8,41\%$ e a URAH com $80,7 \pm 2,53\%$. Apesar de não existirem diferenças significativas quando comparadas com o ácido acetilsalicílico ($P = 0,885$; $P = 0,200$; $P = 0,159$), este último apresentou actividade superior com uma percentagem de inibição de $94,7 \pm 2,83\%$. Por seu turno, o extracto URA, e as fracções URAA e UREA demonstraram actividade pró-inflamatória, tendo obtido percentagens de inibição de $-138,1 \pm 1,17\%$, $-54,5 \pm 2,94\%$ e $-107,6 \pm 1,76\%$, respectivamente. O extracto URE não mostrou quase nenhuma actividade com $0,2 \pm 5,73\%$ de inibição.

Estes últimos extractos e fracções são estatisticamente semelhantes. Pode referir-se, ainda, que é mais evidente que as fracções originárias dos extractos brutos URA e URA com actividade pró-inflamatória, demonstraram actividade anti-inflamatória.

Mais uma vez, as fracções mais activas são de natureza pouco polar ou apolar (URAH, URAD e UREH).

Ao analisar a **Figura 21 e 22** e calculando a semelhança estatística entre as amostras de *I. perado* e *U. rupestris*, verificou-se que a fracção IPAH foi a mais activa, tendo demonstrado diferenças significativas quando comparadas com as fracções de *U. rupestris* ($P = 0,001$).

2 - Efeito dos extractos e fracções na estabilização da membrana

A estabilização da membrana dos eritrócitos pelos extractos e fracções de *I. perado* (**Figuras 23a e 23b**) e *U. rupestris* (**Figuras 24a e 24b**) foi estudada de modo a avaliar a eventual acção anti-inflamatória destas duas plantas.

2.1 - *Ilex perado*

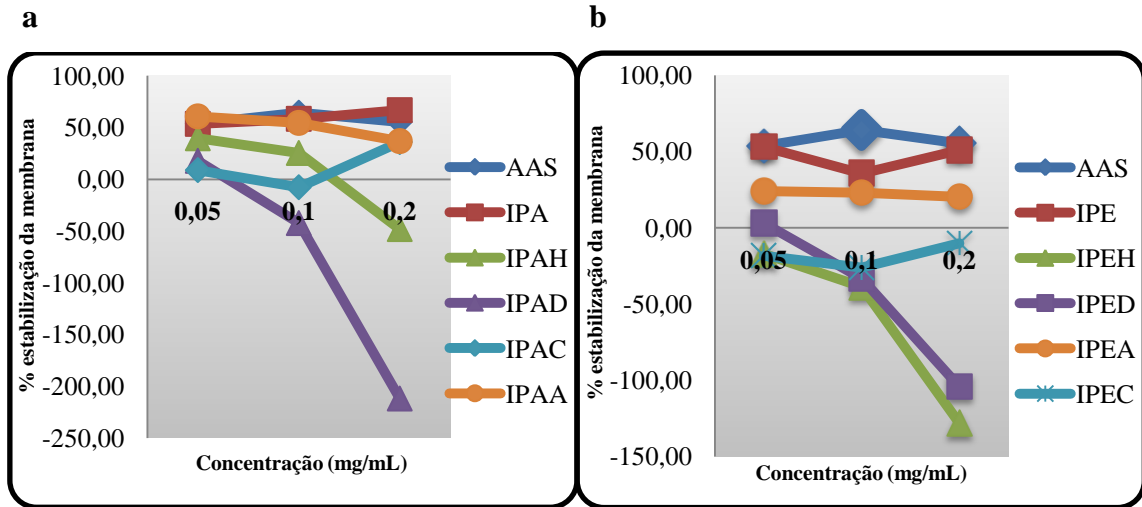


Figura 23a e 23b - Percentagens de estabilização da membrana dos eritrócitos pelos extractos e fracções de *I. perado* e o padrão AAS às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20 mg/mL. **AAS** - Ácido Acetilsalicílico; **IPA** - extracto de acetona; **IPAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **IPAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **IPAC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **IPAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **IPEH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **IPEA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol; **IPEC** - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; **IPE** - fracção de diclorometano do extracto de etanol. Cada valor corresponde à média de dois ensaios.

2.2 - *Umbilicus rupestris*

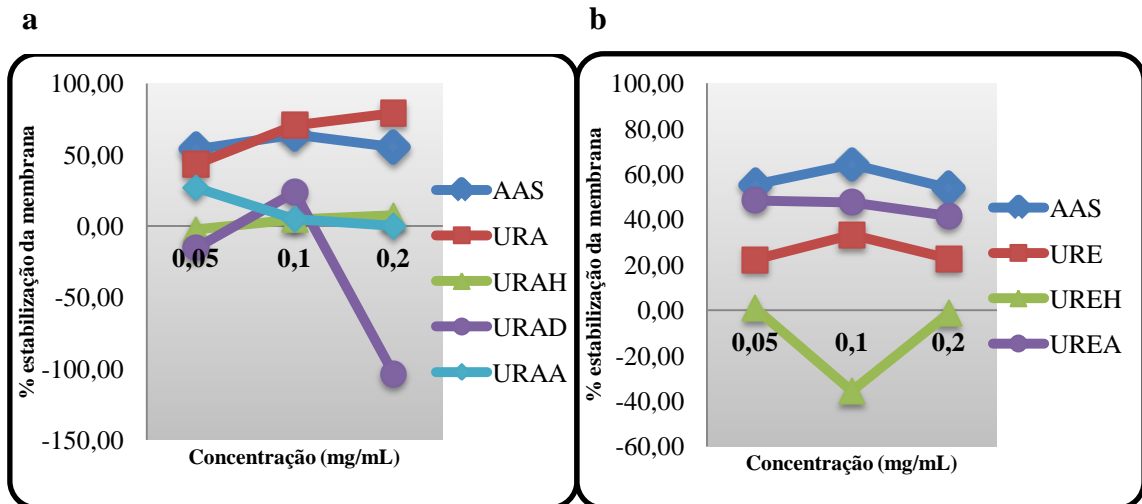


Figura 24a e 24b - Percentagens de estabilização da membrana dos eritrócitos pelos extractos e fracções de *U. rupestris* e o padrão AAS às concentrações de 0,05; 0,10 e 0,20 mg/mL. **URA** - extracto de acetona; **URAH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **URAD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **URAA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **URE** - extracto de etanol; **UREA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol; **UREH** - fracção de hexano do extracto de etanol. Cada valor corresponde à média de dois ensaios.

Ao observar as **Figuras 23a, 23b, 24a e 24b**, não é possível referir quais os extractos e/ou fracções mais activos em relação ao ácido acetilsalicílico, uma vez que as actividades demonstradas não foram dependentes da concentração. Ou seja, quando se aumentou a concentração não se observou um aumento correspondente de actividade. O único aspecto sobre o qual se pode retirar alguma conclusão é relativamente à capacidade de estabilização de cada uma das amostras. As amostras que revelaram uma percentagem de estabilização positiva em todas concentrações testadas são o ácido acetilsalicílico, IPA, IPAA, IPE, IPEA, URA, URE e UREA. Pelo contrário, as amostras IPAH, IPAD, IPAC, IPEH, IPED, IPEC, URAH, URAD, URAA e UREA demonstraram actividade pró-inflamatória neste ensaio. A ausência de uma relação linear entre a concentração e a actividade pode ter sido devida à dificuldade em manter as membranas eritrocitárias intactas ao longo do procedimento. O choque mecânico resultante da centrifugação do sangue e o choque térmico aquando da colocação das amostras no banho a 56 °C podem ter levado ao surgimento de resultados falsos negativos. Uma sugestão de alteração ao ensaio seria a incubação das amostras a 37 °C, inicialmente, aumentando-se a gradualmente até chegar aos 56 °C.

A fim de se poder comparar estatisticamente a capacidade de estabilização da membrana das amostras testadas, analisou-se esta capacidade à concentração de 0,10 mg/mL, apresentando-se o resultado na **Figura 25**.

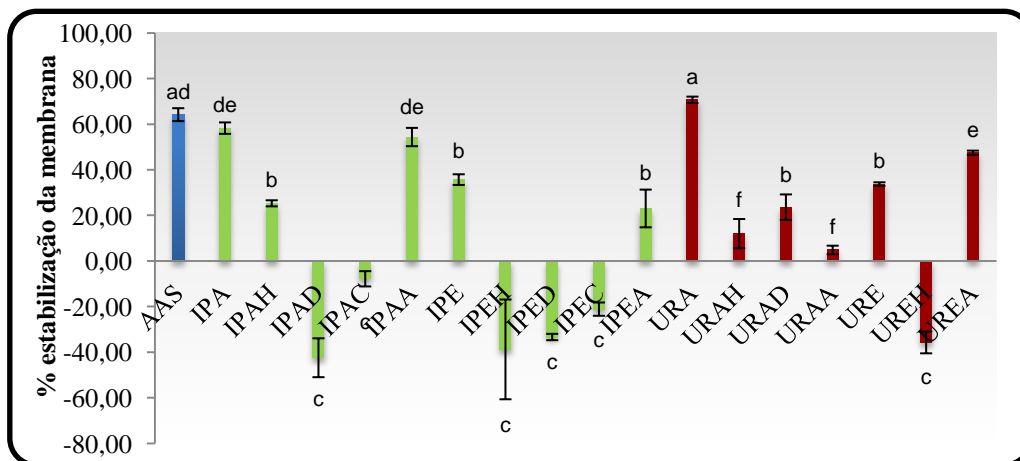


Figura 25 - Percentagens de estabilização da membrana pelos extractos e fracções de *I. perado* e *U. rupestris* e o padrão AAS à concentração de 0,10 mg/mL. **AAS** - Ácido Acetilsalicílico; **IP** - *Ilex perado*; **UR** - *Umbilicus rupestris*; **A** - extracto de acetona; **AH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **AD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **AC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **AA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **E** - extracto de etanol; **EH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **ED** - fracção de diclorometano do extracto de etanol; **EC** - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; **EA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol. Os resultados são expressos como média ± d.p. (desvio padrão) de dois ensaios. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

A partir da análise da **Figura 25**, pode-se afirmar que o extracto URA foi o que melhor estabilizou a membrana dos eritrócitos, inibindo a hemólise a $70,7 \pm 1,40\%$, obtendo melhor resultado que o ácido acetilsalicílico com $64,2 \pm 2,84\%$ de inibição da hemólise. Contudo, não foram observadas diferenças significativas entre estes últimos ($P = 0,695$). É também de destacar a actividade do extracto IPA com capacidade de inibição da hemólise de $58,3 \pm 2,51\%$, e das fracções IPAA com $54,4 \pm 4,01\%$ e UREA com $47,5 \pm 0,93\%$. Novamente, não se constatarem diferenças significativas nestes grupos ($P = 0,992$; $P = 0,083$). As fracções IPAH, IPEA e URAD obtiveram uma actividade significativamente mais baixa do que o padrão ($P = 0,000$) de $25,3 \pm 1,34\%$, $23,1 \pm 8,3\%$ e $23,6 \pm 5,59\%$, respectivamente. O extracto IPE também demonstrou pouca actividade quando comparado com o padrão ($P = 0,000$), com $35,7 \pm 2,34\%$ de inibição da hemólise. Por outro lado, as fracções IPAD, IPAC, IPEH, IPED, IPEC e UREA estimularam a lise da membrana dos eritrócitos.

No ensaio de estabilização da membrana dos eritrócitos, verifica-se que as amostras mais activas são as que contêm compostos ou grupos de compostos maioritariamente polares (IPA, IPAA, URA e UREA). O ácido acetilsalicílico e outros AINEs possuem um grupo carboxílico (COOH) que lhes confere propriedades polares e grupos apolares (Charlier & Michaux, 2003). É possível que os compostos ou grupos de compostos polares interfiram tenham um efeito positivo na estabilidade da membrana.

3 - Efeito dos extractos e fracções na inibição da acção da protease tripsina

3.1 - *Ilex perado*

A fim de testar quais os extractos e/ou fracções com maior actividade de inibição da acção da tripsina, determinou-se o IC_{50} dos extractos de acetona e etanol de *I. perado* e as fracções de hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etilo provenientes do fraccionamento dos dois extractos. A **Tabela 4** mostra a capacidade das amostras de *I. perado* e do ácido acetilsalicílico inibirem a acção da tripsina.

Tabela 4 - Inibição da acção da tripsina pelos extractos e fracções de *I. perado* e o padrão Ácido Acetilsalicílico.

Amostra	Inibição da protease (IC ₅₀ mg/mL)
AAS	0,32 ^a ± 0,04
IPA	0,16 ^b ± 0,06
IPAH	0,96 ^c ± 0,12
IPAD	0,55 ^d ± 0,07
IPAC	0,29 ^{ab} ± 0,07
IPAA	0,49 ^d ± 0,03
IPE	> 1 ^c
IPEH	0,16 ^b ± 0,02
IPEd	> 1 ^c
IPEC	> 1 ^c
IPEA	> 1 ^c

AAS – Ácido Acetilsalicílico; IPA – extracto de acetona; IPAH - fracção de hexano do extracto de acetona; IPAD - fracção de diclorometano do extracto de acetona; IPAC - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; IPAA - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; IPE – extracto de etanol; IPEH - fracção de hexano do extracto de etanol; IPEd - fracção de diclorometano do extracto de etanol; IPEC - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; IPEA - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol. Os resultados são expressos como média ± d.p. (desvio padrão) de três ensaios. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão linear. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Com base nos dados obtidos da **Tabela 4**, verifica-se que o extracto IPA e as fracções IPAC e IPEH foram os mais activos com IC₅₀ de 0,16, 0,29 e 0,16 mg/mL, respectivamente, não se tendo observado diferenças significativas entre estes ($P = 0,058$; $P = 1,000$). O ácido acetilsalicílico apresentou uma actividade de inibição menor, com um IC₅₀ de 0,32 mg/mL. Apesar das fracções IPAD e IPAA terem sido menos activas que a aspirina, facto é que mostraram alguma actividade, sendo estatisticamente semelhantes ($P = 0,902$), com IC₅₀ de 0,55 e 0,49 mg/mL, respectivamente. Contrariamente, o extracto IPE e as fracções IPEd, IPEC e IPEA não demonstraram actividade que permitisse calcular os seus IC₅₀, sendo superiores a 1 mg/mL.

Na sequência dos resultados obtidos, não é possível concluir quais os grupos de compostos presumivelmente responsáveis por esta actividade de inibição pois as amostras mais activas são distintas quanto à sua forma de preparação (IPA, IPAC e IPEH).

3.2 - *Umbilicus rupestris*

Igualmente para *U. rupestris* testou-se quais os extractos e/ou fracções que eram mais activos na inibição da acção da tripsina, determinando-se o IC₅₀ dos extractos de

acetona e etanol e as fracções de hexano, diclorometano e acetato de etilo provenientes do fraccionamento dos dois extractos. A **Tabela 5** mostra a capacidade das amostras de *U. rupestris* e do ácido acetilsalicílico inibirem a acção da tripsina.

Tabela 5 - Inibição da acção da tripsina pelos extractos e fracções de *U. rupestris* e o padrão Ácido Acetilsalicílico.

Amostra	Inibição da protease (IC ₅₀ mg/mL)
AAS	0,32 ^a ± 0,04
URA	0,05 ^b ± 0,02
URAH	> 1 ^c
URAD	> 1 ^c
URAA	0,26 ^{ac} ± 0,04
URE	> 1 ^c
UREH	0,14 ^{bc} ± 0,06
UREA	> 1 ^c

AAS - Ácido Acetilsalicílico; URA - extracto de acetona; URAH - fracção de hexano do extracto de acetona; URAD - fracção de diclorometano do extracto de acetona; URAA - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; URE - extracto de etanol; UREH - fracção de hexano do extracto de etanol; UREA - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol. Os resultados são expressos como média ± d.p. (desvio padrão) de três ensaios. Os valores de IC₅₀ foram calculados por regressão linear. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Pela observação da **Tabela 5**, é possível afirmar que o extracto URA foi mais activo do que o ácido acetilsalicílico, tendo um IC₅₀ de 0,05 mg/mL, 6,4 vezes mais baixo que o IC₅₀ de 0,32 mg/mL obtido pela aspirina. Também mostrou maior poder inibidor do que as restantes amostras testadas, apesar de se encontrar no mesmo grupo estatístico da fracção UREH com IC₅₀ de 0,14 mg/mL ($P = 0,440$). A fracção URAA também se revelou activa com IC₅₀ de 0,26 mg/mL, comparável estatisticamente à aspirina ($P = 0,915$). O extracto URE e as fracções URAH, URAD não demonstraram actividade que permitisse calcular os seus IC₅₀, sendo superiores a 1 mg/mL.

Tal como no caso dos resultados de *I. perado*, também não é possível concluir quais os grupos de compostos responsáveis pela actividade demonstrada por algumas amostras testadas de *U. rupestris*.

Tendo em conta os dados obtidos presentes na **Tabela 4 e 5**, verifica-se que o extracto mais activo das duas plantas é o extracto de acetona e que as fracções resultantes do seu fraccionamento perdem alguma da actividade. Esta perda pode dever-se à degradação de compostos que são sensíveis à luz ou até ao ar. O processo de separação ou purificação pode alterar a proporção destes compostos em termos

qualitativos ou quantitativos (Garg *et al.*, 2008). Uma outra explicação possível para este fenómeno é a sinergia complexa que resulta da combinação da actividade de compostos ou grupos de compostos presentes nos extractos (Bogers *et al.*, 2006). Por seu turno, uma das fracções originárias do extracto de etanol de *U. rupestris* apresentou actividade, apesar de não ser detectada no extracto original.

Após a análise dos resultados dos ensaios de *screening* preliminar, decidiu-se fraccionar as fracções mais activas, ou seja, a IPAC, IPEH e UREH. Estas demonstraram actividade comparável ou até superior à do padrão ácido acetilsalicílico, no ensaio de inibição da desnaturação da albumina e no teste de inibição da acção da protease tripsina. Sendo assim, procedeu-se à determinação da actividade anti-inflamatória por mecanismos mais específicos, avaliando-se a inibição de duas enzimas (ciclooxigenase e lipoxigenase) responsáveis pela produção dos eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), uma das mais importantes classes de mediadores da resposta inflamatória.

4 - Efeito das sub-fracções na actividade da ciclooxigenase 1 e 2

Um dos muitos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) comercializados é a indometacina, cujo mecanismo de acção envolve a inibição das COXs. Por esta razão, a indometacina foi utilizada no ensaio como composto de referência no estudo da actividade anti-inflamatória exibida pelas sub-fracções de *I. perado* e *U. rupestris*.

O resultado da percentagem de inibição das enzimas COX pelas sub-fracções obtidas e pela indometacina encontra-se apresentado na **Figura 26**.

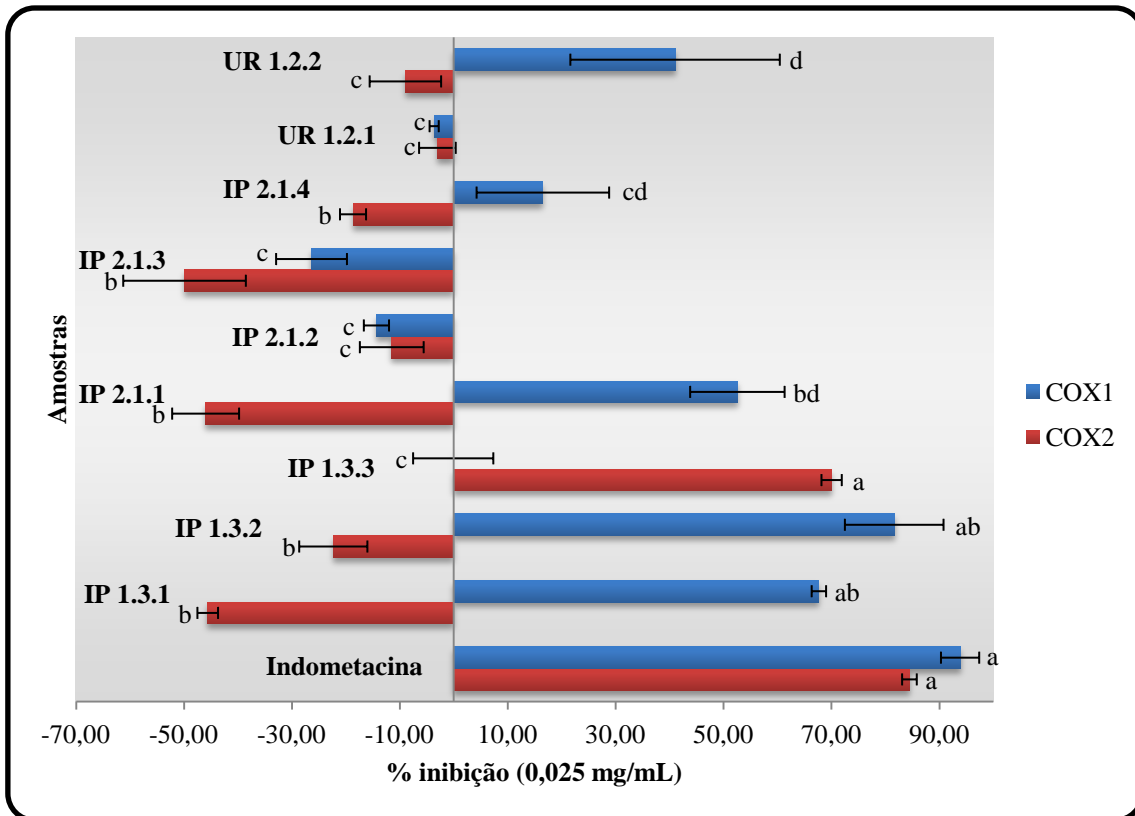


Figura 26 - Percentagens de inibição da actividade da cicloxigenase 1 e 2 pelas sub-fracções e o padrão indometacina à concentração de 0,025 mg/mL. Cada coluna corresponde à média de dois ensaios. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

A capacidade de inibição *in vitro* das enzimas COX-1 e COX-2 foi determinada pela transformação do ácido araquidónico em prostaglandina H_2 catalisada pela COX. A prostaglandina H_2 é, então, reduzida a prostaglandina $F_{2\alpha}$ que é detectada pelo imunoensaio enzimático. Na **Figura 26**, observa-se a percentagem de inibição de cada amostra obtida sobre a actividade das enzimas COX-1 e COX-2. As sub-fracções IP 1.3.1 e IP 1.3.2 exibiram uma inibição considerável da enzima COX-1, expressa constitutivamente em quase todos os tecidos (Dubois *et al.*, 1998; Ricciotti & FitzGerald, 2011), de $67,7 \pm 1,33\%$ e $81,7 \pm 9,14\%$, respectivamente. Nestes casos, verificou-se uma produção mais baixa de prostaglandinas comparativamente ao controlo negativo. No entanto, ficou aquém da inibição conseguida pelo padrão indometacina que demonstrou actividade de inibição de $93,9 \pm 3,54\%$. A actividade demonstrada pelas sub-fracções não revelou diferenças significativas relativamente ao padrão. Pelo contrário, as restantes sub-fracções analisadas mostraram uma actividade inibidora significativamente mais baixa (< 52,6%) do que a indometacina.

No que respeita à inibição da COX-2, enzima expressa principalmente em condições inflamatórias (Martel-Pelletier *et al.*, 2003; Goossens *et al.*, 2007), somente a

indometacina e a sub-fracção IP 1.3.3 inibiram significativamente a sua actividade a $84,5 \pm 1,36\%$ e a $70,1 \pm 1,88\%$, respectivamente. As outras sub-fracções testadas demonstraram uma acção pró-inflamatória ao intensificarem a actividade da enzima, com percentagens de inibição inferiores a zero.

De modo a avaliar a selectividade das amostras para a isoforma COX-2, calculou-se a razão das percentagens de inibição da COX-2 sobre a COX-1. Uma vez que somente a indometacina e a sub-fracção IP 1.3.3 não evidenciaram actividade pró-inflamatória, só se calculou o Índice de Selectividade (IS) para estas últimas. Uma razão COX-2/COX-1 superior a 1 reflecte uma selectividade para a COX-2 enquanto que uma razão COX-2/COX-1 inferior a 1 indica uma preferência pela COX-1. Segundo Warner e colaboradores, a indometacina inibe as duas enzimas, contudo apresenta uma ligeira preferência pela COX-1 (Warner *et al.*, 1999). No ensaio realizado verificou-se o mesmo fenómeno, ou seja, a indometacina inibiu preferencialmente a enzima COX-1, tendo apresentado um $IS < 1$. Por seu turno, a sub-fracção IP 1.3.3 resultou num $IS \gg 1$, o que indica que é um inibidor selectivo da COX-2.

Na sequência do que foi referido, pode afirmar-se que as sub-fracções de *I. perado* parecem ser mais activas quando comparadas com as de *U. rupestris*.

5 - Efeito das sub-fracções na actividade da 15-lipoxigenase

A inibição *in vitro* da 15-LOX pelas sub-fracções de *I. perado* e *U. rupestris* foi determinada usando uma lipoxigenase purificada que transforma o ácido araquidónico em hidroperóxidos, os quais são detectados através da adição de um cromógeno, como descrito pelo fabricante (Cayman Chemical Co.). A quercetina, um conhecido inibidor da 15-LOX, foi utilizada como controlo positivo (Chen *et al.*, 2009). Os resultados encontram-se apresentados na **Figura 27**.

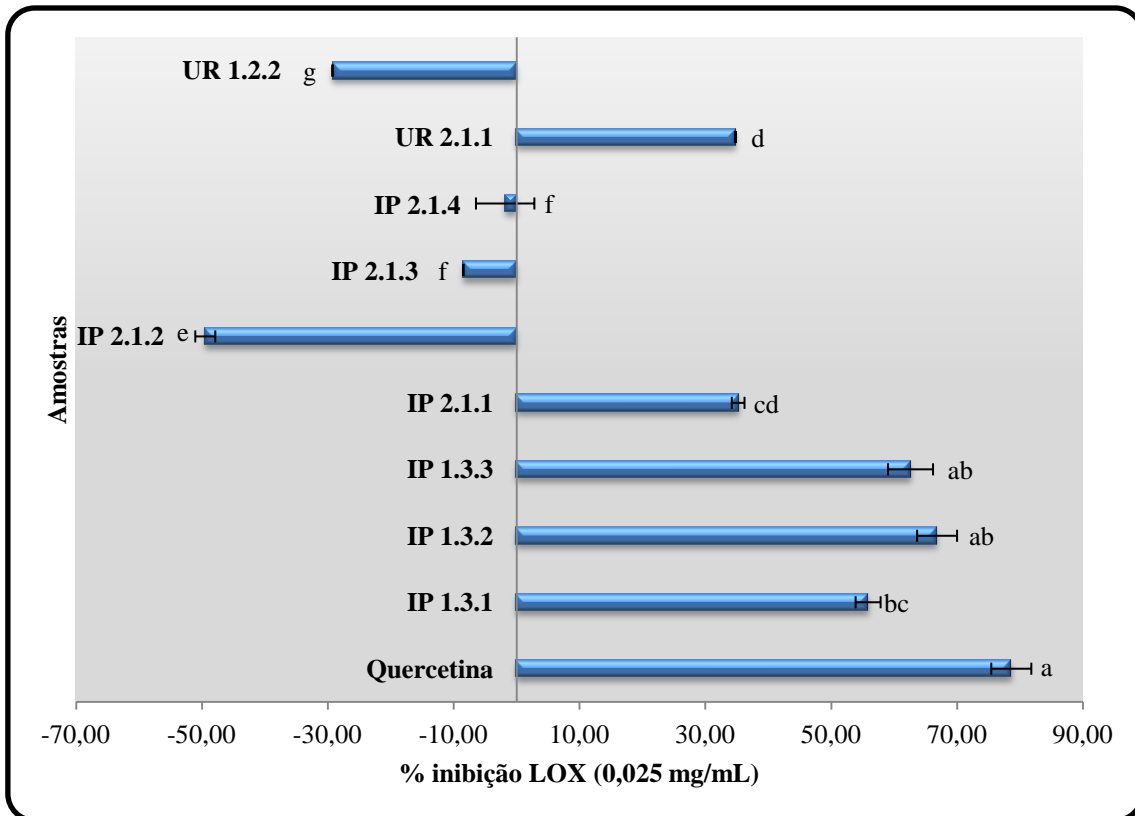


Figura 27 - Percentagens de inibição da actividade da lipoxigenase pelas sub-frações e o padrão quercetina à concentração de 0,025 mg/mL. Cada coluna corresponde à média de dois ensaios. De acordo com o teste de Tukey, as médias assinaladas com letras diferentes indicam diferenças significativas a $P \leq 0,05$.

Após analisar a **Figura 27**, verifica-se que as sub-frações IP 1.3.2 e IP 1.3.3 inibiram significativamente a actividade da enzima 15-LOX, com percentagens de inibição de $66,9 \pm 3,17\%$ e de $62,6 \pm 3,58\%$. De acordo com o Teste de Tukey, apesar de terem obtido uma inibição mais baixa da enzima, estas amostras não mostraram diferenças significativas em relação ao padrão avaliado, a quercetina, que apresentou uma percentagem de inibição de $78,6 \pm 3,18\%$. Ou seja, a formação de hidroperóxidos a partir do ácido araquidónico foi inibida a 78,6 % com a quercetina. Embora as sub-frações IP 1.3.1, IP 2.1.1 e UR 2.1.1 tenham demonstrado diferenças significativas comparativamente à quercetina ($P = 0,023$; $P = 0,000$), apresentaram alguma actividade de inibição sobre a 15-LOX de $55,9 \pm 1,99\%$, $35,2 \pm 1,01\%$ e de $34,8 \pm 0,00\%$, respectivamente. As restantes sub-frações analisadas não demonstraram qualquer actividade de inibição, sendo consideradas pró-inflamatórias ao estimularem a actividade da enzima ($< 1,8\%$).

Tal como constatado na inibição da cicloxigenase, o padrão repete-se no que se refere à inibição da lipoxigenase. Novamente, as sub-frações mais activas são as provenientes de *I. perado* em relação às sub-frações de *U. rupestris*.

6 - Análise fitoquímica

6.1 - Perfil fitoquímico dos extractos e fracções de *I. perado* e *U. rupestris* em TLC

A análise fitoquímica possibilita a identificação dos principais grupos de metabolitos secundários que possam estar relacionados com as actividades biológicas. A utilização de reveladores específicos permite avaliar a presença destes grupos através do estudo dos perfis fitoquímicos nas placas de TLC.

Foi avaliada a presença de polifenóis, saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteróides e alcalóides, como demonstrado na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Perfis fitoquímicos dos extractos e fracções de *I. perado* e *U. rupestris*.

	Polifenóis	Saponinas	Flavonóides	Ácidos fenólicos	Esteróides	Alcalóides
IPA	+	+	+	+	+	+
IPAH	+	+	-	-	+	+
IPAD	+	+	-	+	+	+
IPAC	+	+	-	-	+	-
IPAA	+	+	+	+	+	+
IPE	+	+	+	+	+	+
IPEH	+	+	-	+	+	-
IPED	+	+	-	+	+	-
IPEC	+	+	+	+	+	+
IPEA	+	+	+	+	+	+
URA	+	-	+	+	+	+
URAH	+	-	+	-	+	+
URAD	+	-	+	-	-	-
URAA	+	-	+	+	-	+
URE	+	-	+	+	+	+
UREH	+	-	-	-	+	+
UREA	+	-	+	+	-	+

+ – reacção positiva; - – ausência de reacção

IP - *Ilex perado*; **UR** - *Umbilicus rupestris*; **A** - extracto de acetona; **AH** - fracção de hexano do extracto de acetona; **AD** - fracção de diclorometano do extracto de acetona; **AC** - fracção de clorofórmio do extracto de acetona; **AA** - fracção de acetato de etilo do extracto de acetona; **E** - extracto de etanol; **EH** - fracção de hexano do extracto de etanol; **ED** - fracção de diclorometano do extracto de etanol; **EC** - fracção de clorofórmio do extracto de etanol; **EA** - fracção de acetato de etilo do extracto de etanol.

Os dados da **Tabela 6** permitem comprovar que todas as amostras possuem polifenóis. Somente os extractos e fracções de *I. perado* possuem saponinas. Em relação aos flavonóides, verifica-se que os extractos de *I. perado* e de *U. rupestris* possuem esta classe de compostos. As fracções mais polares de *I. perado* também evidenciam a

presença de flavonóides (IPAA, IPEC, IPEA). Em *U. rupestris*, constata-se que quase todas as fracções possuem flavonóides, à excepção de UREH e URED. Os ácidos fenólicos estão presentes nos extractos destas duas plantas e nas fracções IPAD, IPAA, IPEH, IPED, IPEC, IPEA, URAA e UREA. No entanto, não seria de esperar a presença de ácidos fenólicos nas fracções mais apolares o que indica que poderão tratar-se de falsos positivos. Os esteróides encontram-se em quase todas as amostras testadas, à excepção de URAD, URAA e UREA. Por seu turno, os alcalóides foram detectados em todas as amostras, excepto em IPAC, IPEH, IPED e URAD. Contudo, os alcalóides não são normalmente extraídos com solventes apolares, tratando-se provavelmente de falsos positivos devidos à fraca selectividade do reagente de Wagner (Brossi, 1988).

A detecção da presença de saponinas, flavonóides e ácidos fenólicos está de acordo com outros estudos fitoquímicos sobre *Ilex paraguariensis* que indicam a ocorrência destas classes de compostos (Bracesco *et al.*, 2011; Colpo *et al.*, 2007). Segundo Viornery e colaboradores, sobre o género *Umbilicus*, só foram publicados quatro estudos sobre o isolamento e caracterização de metabolitos secundários, de entre os quais foram isolados três fenil-propanóides e *O*-glucosilflavonol (Viornery *et al.*, 2000).

De modo a avaliar a relação existente entre a presença ou ausência das classes de compostos testadas com os resultados dos ensaios de *screening*, calculou-se o coeficiente de correlação de Pearson para todas as amostras. Não se verificou uma relação linear entre a presença/ausência das classes de compostos testadas e os resultados dos ensaios de *screening* ($r \approx 0$), podendo estar relacionado com aparecimento de falsos positivos nos testes fitoquímicos.

6.2 - Análise fitoquímica das sub-fracções de *I. perado* em HPLC

A análise fitoquímica em HPLC foi realizada com o intuito de averiguar os compostos ou grupos de compostos com maior actividade anti-COX e anti-LOX, presentes nas sub-fracções de *I. perado*, IP 1.3.1, IP 1.3.2 e IP 1.3.3. Os espectros UV gerados pelo DAD auxiliaram a pesquisa destes compostos. Nas **Figura 28, 29 e 30** são apresentados os cromatogramas e os espectros UV dos compostos analisados das sub-fracções IP 1.3.1, IP 1.3.2 e IP 1.3.3, respectivamente. Por conveniência, os compostos

foram designados de **A, B, C, D, E, F** e **G**. Os espectros UV de cafeína, teofilina, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, ácido gálico e quercetina encontram-se na **Figura 31**.

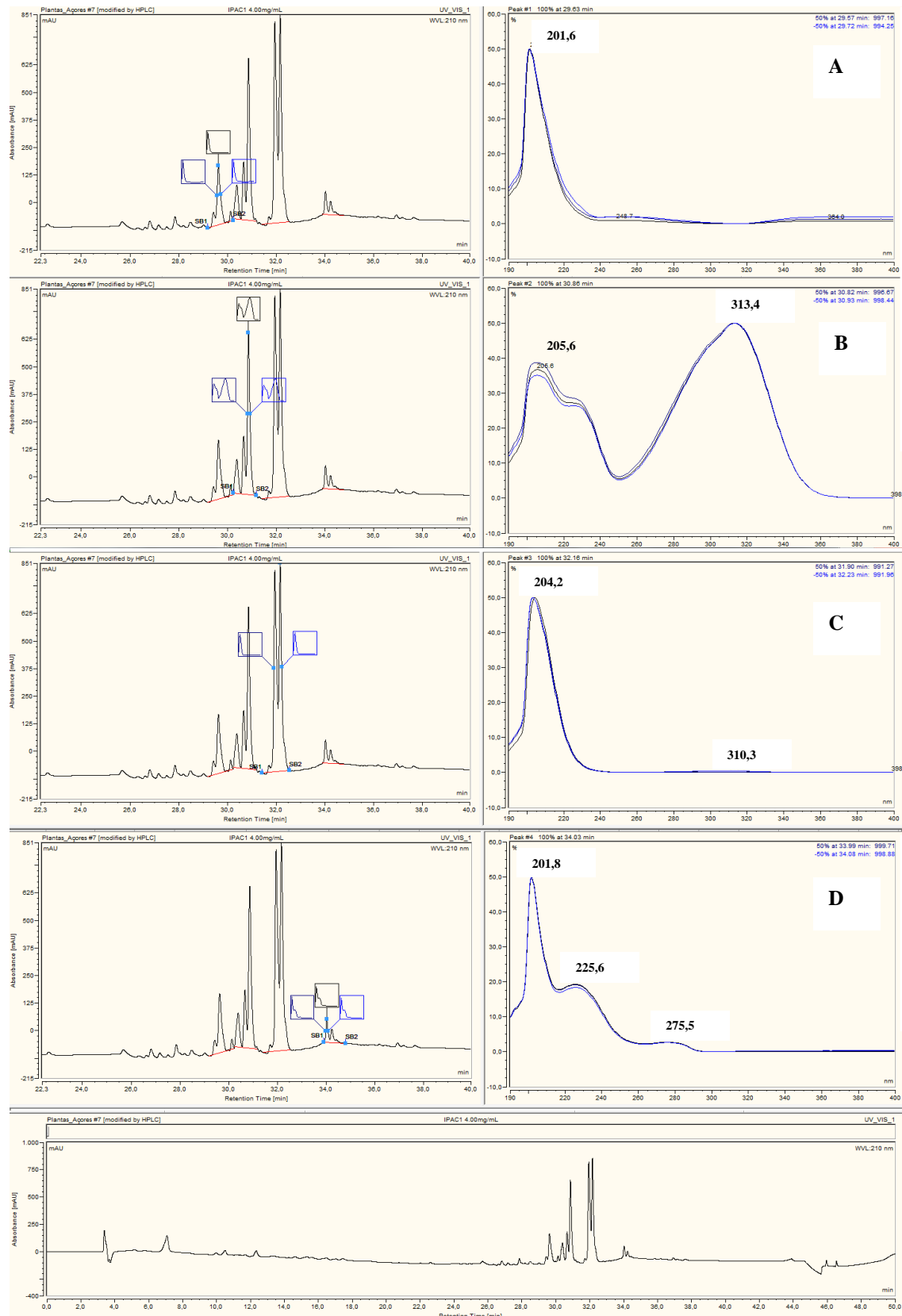


Figura 28 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.1.

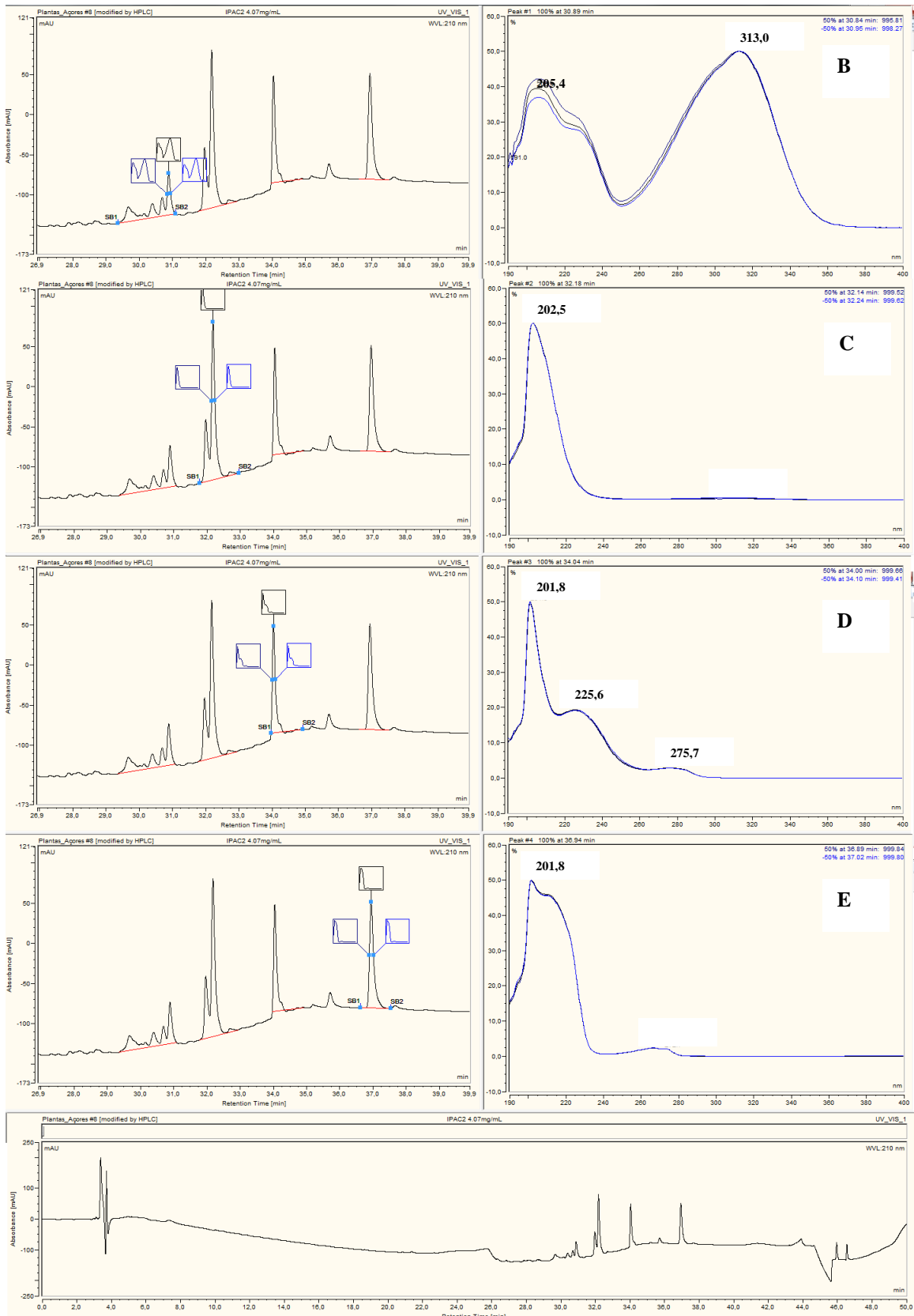


Figura 29 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.2.

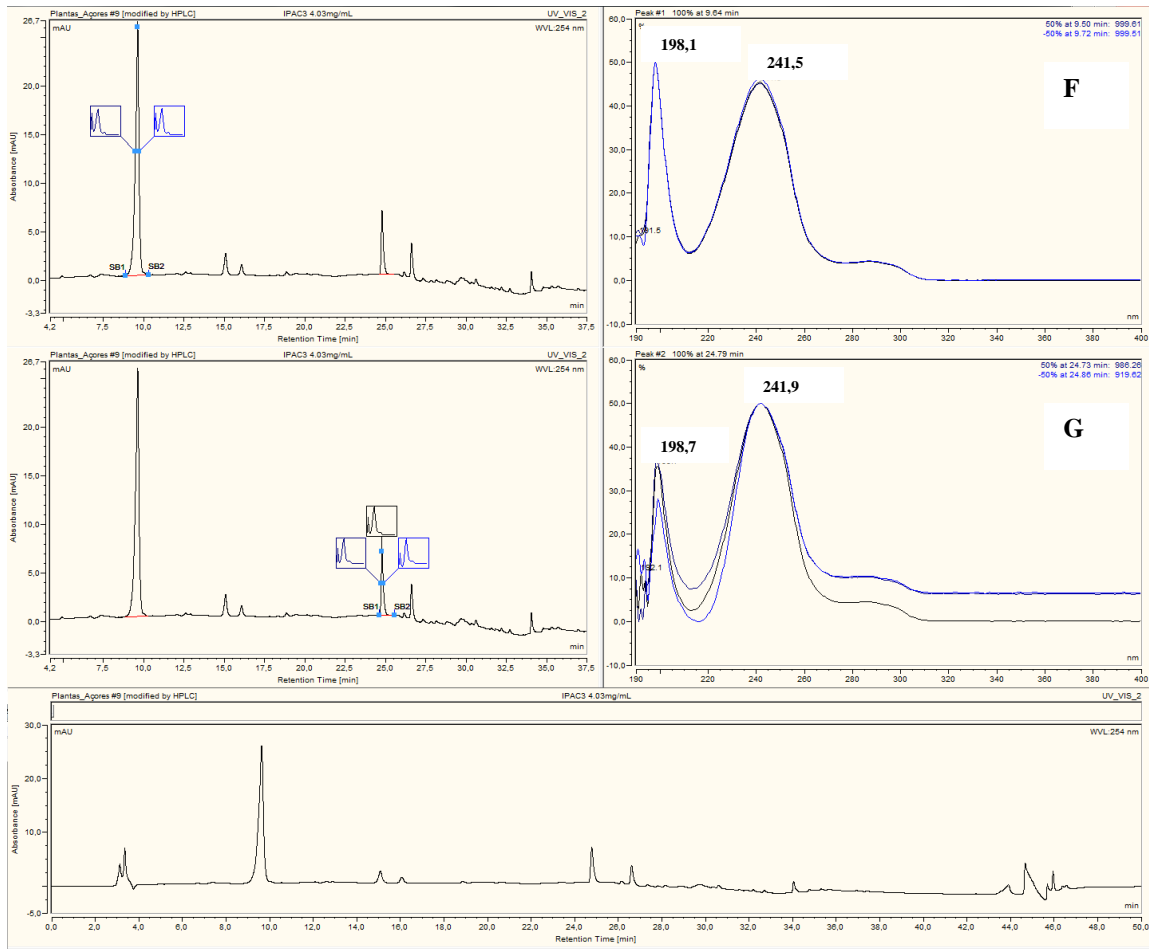


Figura 30 - Perfis de HPLC e UV da sub-fracção IP 1.3.3.

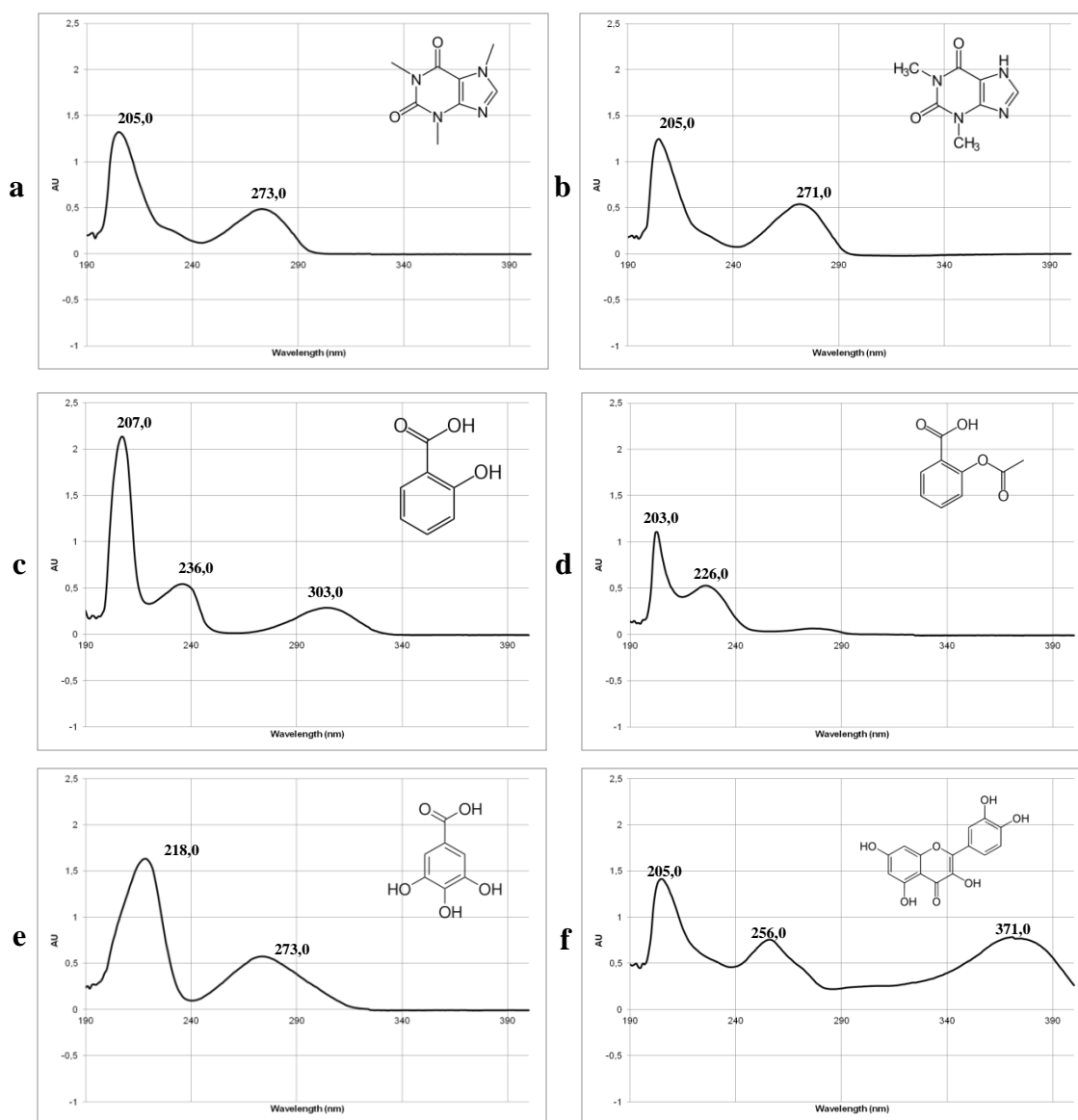


Figura 31 - Perfis UV de cafeína (a), teofilina (b), ácido salicílico (c), ácido acetilsalicílico (d) ácido gálico (e) e quercetina (f).

Ao analisar as **Figuras 28, 29 e 30**, constata-se que a sub-fracção mais polar IP 1.3.3 é a que possui compostos mais polares com tempos de retenção (R_t) mais baixos, como seria de esperar. As sub-fracções IP 1.3.1 e IP 1.3.2 partilham alguns compostos na sua constituição, nomeadamente os compostos **B, C e D**. A sub-fracção 1.3.3 apresenta dois compostos distintos (**F e G**) que não estão presentes nas outras sub-fracções.

Em princípio, é possível afirmar que nenhum dos compostos é um flavonóide uma vez que este grupo de compostos apresenta tipicamente dois picos de absorção máxima entre 240-285 nm e 300-550 e tal não se verifica nos compostos das sub-fracções analisadas (Campos, 2005). O composto **B** pode ser um ácido fenólico pois

apresenta um espectro UV semelhante a alguns ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogénico, ácido ferúlico, entre outros (Plazonić *et al.*, 2009). Por seu turno, o composto **D** tem um espectro UV semelhante ao do ácido salicílico e ácido acetilsalicílico (**Figura 31**). De acordo com a literatura, *I. paraguariensis* possui xantinas como a cafeína, teobromina e a teofilina. Suspeita-se que os compostos **F** e **G** sejam xantinas, uma vez que apresentam espectros UV semelhantes aos desta família de compostos, como verificado na cafeína e teofilina na **Figura 31**. Contudo, não se conseguiu identificar com esta técnica a que classe pertencem os compostos **A**, **C** e **E** das sub-fracções IP 1.3.1 e IP 1.3.2 pois estes apresentam picos de absorção máxima próxima de 200 nm e uma grande maioria de compostos absorve em torno deste comprimento de onda.

IV - Discussão

O trabalho realizado teve como objectivo investigar a presença de componentes anti-inflamatórios nas folhas de *Ilex perado* e *Umbilicus rupestris*.

Os AINEs tradicionais como a aspirina, ibuprofeno e o diclofenac representam um grupo de anti-inflamatórios eficazes que também são responsáveis por efeitos secundários quando utilizados por períodos prolongados. O seu modo de acção baseia-se na inibição não selectiva da COX (Charlier & Michaux, 2003). Por seu turno, os AINEs inibidores selectivos da COX-2 são eficazes, contudo, provocam complicações do foro renal e cardiovascular (Charlier & Michaux, 2003; Rao & Knaus, 2008; Gambaro, 2002). O estudo efectuado teve como premissa que o composto ou grupo de compostos anti-inflamatórios ideais seriam os que inibem simultaneamente as enzimas COX-2 e a 15-LOX. A inibição da produção de prostaglandinas pela via da COX permite uma diminuição da resposta inflamatória em doenças crónicas como cancro, asma, artrite reumatóide e nas doenças auto-imunes (Harizi *et al.*, 2008; Masresha *et al.*, 2012). Já a inibição da produção de hidroperóxidos pela via da 15-LOX promove uma redução da acumulação celular de lípidos e das citocinas pró-inflamatórias na aterosclerose (Magnusson *et al.*, 2012; Walther *et al.*, 1999). Portanto, a inibição da biossíntese destes mediadores inflamatórios pelo bloqueio das enzimas COX e LOX poderá representar uma importante alternativa no tratamento de muitos estados patológicos que têm por base uma resposta inflamatória.

Ilex perado, uma das plantas seleccionada para a investigação da actividade anti-inflamatória, é relacionada filogeneticamente com *I. paraguariensis*, reconhecida pelos seus efeitos anti-inflamatórios. A outra planta seleccionada, *Umbilicus rupestris*, é usada na medicina tradicional como anti-inflamatória tópica (Corsépius, 1997; Pontes & Braga, 2006).

Deste modo, avaliou-se a actividade anti-inflamatória dos extractos brutos e as fracções das folhas destas plantas em três ensaios de *screening* de actividade anti-inflamatória baseados em mecanismos bioquímicos distintos. Escolheram-se as fracções mais activas nestes ensaios tendo sido, subsequentemente, fraccionadas até se obterem as sub-fracções. Verificou-se que a sub-fracção IP 1.3.2 proveniente da fracção de clorofórmio de *I. perado* demonstrou actividade inibidora significativa da COX-1 e da 15-LOX, sendo igualmente potente em relação à indometacina no ensaio da COX e em comparação com a quercetina no ensaio da LOX, sob as mesmas condições experimentais ($P < 0,05$). Já a sub-fracção IP 1.3.3 proveniente da fracção de clorofórmio de *I. perado* demonstrou actividade inibidora significativa da COX-2 e da

15-LOX semelhante à dos padrões usados nos dois ensaios, a $P < 0,05$. Verifica-se, então, que a sub-fracção IP 1.3.3 poderá ser uma boa alternativa em relação aos AINEs tradicionais pois inibe selectivamente as enzimas COX-2 e a 15-LOX. A inibição preferencial da COX-2 sobre a COX-1 aliada à inibição da 15-LOX é de interesse actual no desenvolvimento de novos agentes anti-inflamatórios (Charlier & Michaux 2003; Reddy *et al.*, 2008). No entanto, será necessário comprovar esta actividade *in vivo*, calcular a concentração necessária para inibir 50% da actividade das enzimas COX e LOX (IC_{50}) e avaliar a actividade de inibição da 5-LOX, responsável pela produção de importantes mediadores da resposta inflamatória, os leucotrienos.

Em outras plantas do género de *I. perado*, foi constatado que um dos mecanismos inflamatórios sob o qual os compostos ou grupos de compostos actuam é na inibição da expressão da COX-2 e a produção de prostaglandina E_2 , uma das prostaglandinas mais abundantemente produzidas no organismo e que está envolvida nos processos clássicos da inflamação (Bracesco *et al.*, 2011; Puangpraphant & Mejia, 2009; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Wang *et al.*, 2008). A sub-fracção IP 1.3.3 mostrou selectividade em relação à COX-2 sobre a COX-1. No entanto, é necessário determinar o efeito que esta sub-fracção tem na inibição da expressão destas enzimas.

A presença de saponinas parece ser a principal razão da acção anti-inflamatória evidenciada em plantas do género *Ilex*. Foi observado em estudos que a fracção pura de saponinas de *Ilex pubescens* e as fracções com matesaponinas (saponinas de *Ilex paraguariensis*) inibiram a expressão da enzima COX-2 em ratos com edema (Puangpraphant *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008). Uma das formas de se extraírem as matesaponinas é através da extracção do material vegetal com clorofórmio (Puangpraphant & Mejia, 2009). Contudo, através da análise fitoquímica realizada em HPLC não se detectou a presença de saponinas nas sub-fracções de clorofórmio de *I. perado*.

De acordo com Agnihotri e colaboradores (2010), já foi elucidado que os flavonóides são os principais agentes anti-inflamatórios isolados de plantas, sendo que estes podem inibir as vias da COX e da LOX na cascata do ácido araquidónico, dependendo da sua estrutura química (Agnihotri *et al.*, 2010). A análise fitoquímica em HPLC não evidenciou a presença de flavonóides nas sub-fracções de clorofórmio de *I. perado*.

De acordo com a análise efectuada em HPLC, a sub-fracção IP 1.3.3 contém na sua constituição xantinas sendo que estas poderão ser teobromina, cafeína ou os seus

derivados. Já foi demonstrado que a cafeína inibe significativamente a COX-2, com uma actividade mais elevada do que o ácido acetilsalicílico (Chu *et al.*, 2012). No entanto, o seu modo de acção sobre a 15-LOX ainda não é conhecido. Em relação à teobromina, não se tem conhecimento de como actua sobre as COX e a 15-LOX. As sub-frações IP 1.3.1 e IP 1.3.2 têm uma constituição similar o que pode explicar uma inibição da COX-1 e da 15-LOX semelhantes. No entanto, com a espectroscopia UV, não se conseguiu determinar quais os compostos que estão na sua constituição e que são responsáveis pelas actividades demonstradas.

A actividade reduzida demonstrada pelas amostras de *U. rupestris* pode não ser representativa uma vez que só se testou as sub-frações mais apolares desta planta. Seria necessário avaliar, pelo menos, mais um grupo de sub-frações resultantes de uma fracção mais polar, como o efetuado para *I. perado*. Contudo, por questões de falta de recursos, tal não foi possível.

CONCLUSÃO

Após a realização do trabalho de investigação que culminou com a escrita desta dissertação, que tinha como objectivo principal a determinação da actividade anti-inflamatória de duas plantas da Flora dos Açores, *Ilex perado* e *Umbilicus rupestris*, pode concluir-se que *I. perado* revelou-se bastante promissora ao demonstrar actividades pronunciadas anti-COX e anti-LOX nas suas sub-fracções. Particularmente, a sub-fracção mais polar IP 1.3.3 demonstrou actividade de inibição selectiva da COX-2, enzima envolvida em quase todos os processos inflamatórios, e da 15-LOX, enzima que possui um papel importante no aparecimento da aterosclerose. Os compostos responsáveis por esta actividade parecem ser de natureza polar, nomeadamente xantinas como evidenciado na análise fitoquímica em HPLC. A caracterização destes compostos e o seu isolamento assume extrema relevância. Portanto, a ser verificada esta actividade *in vivo*, estes compostos apresentam-se como potenciais alternativas aos AINEs comercializados se forem mais eficazes e provocarem menos efeitos secundários.

As sub-fracções de *U. rupestris* mostraram-se pouco activas na inibição das COX e da 15-LOX. Seria necessário testar sub-fracções mais polares. Contudo, a cascata inflamatória é muito complexa e, como tal, uma planta anti-inflamatória que não exhibe actividade num determinado mecanismo pode ter efeito em outros alvos da cascata inflamatória.

PERSPECTIVAS DE TRABALHO FUTURO

Apesar de se terem atingido quase todos os objectivos propostos no âmbito desta tese, ficaram ainda algumas conclusões por tirar e ligar algumas “pontas soltas” em relação aos resultados obtidos. Primeiramente, não foi possível identificar os compostos nas sub-fracções de *I. perado* responsáveis pela actividade anti-inflamatória demonstrada no estudo. Seria necessário prosseguir a purificação, até à obtenção de compostos puros, e empregar outras técnicas de identificação de compostos como, por exemplo, espectroscopia de infra-vermelhos ou ressonância magnética nuclear, e aliar estes dados aos obtidos por espectroscopia UV.

Uma vez que a sub-fracção mais activa é constituída por uma mistura de compostos, torna-se mais difícil avaliar a dosagem correcta a aplicar e os efeitos secundários daí resultantes, pelo que seria fundamental isolar os compostos pretendidos e testá-los quanto às suas actividades de inibição das enzimas COX-1, COX-2 e 15-LOX, determinando-se o IC₅₀. Além disso, era interessante estudar a actividade de inibição da 5-LOX, calculando-se também o IC₅₀.

Um estudo relevante seria a avaliação destas actividades *in vivo*, através da análise do tamanho de placas ateroscleróticas em ratos com aterosclerose, indução de edema em ratos, avaliando-se a quantidade de prostaglandinas e leucotrienos produzidos ou ainda a inibição da expressão da COX-1 e COX-2 em células de macrófagos RAW 264,7 através de *Western Blot*.

Uma vez que *U. rupestris* é utilizada na medicina popular nos Açores como anti-inflamatória, assume relevância a investigação da actividade das sub-fracções mais polares na inibição das enzimas COX, 15-LOX, 5-LOX e em outros mecanismos envolvidos na resposta inflamatória através da quantificação de óxido nítrico, de citocinas em ensaios com células de macrófagos J774.A1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnihotri S, Wakode S & Agnihotri A, 2010. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. *Indian Journal of Natural Products and Resources* 1(2): 150-167.
- Amabeoku GJ & Kabatende J, 2012. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Leaf Methanol Extract of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae). *Adv Pharmacol Sci.*, 6 pp.
- Angelis RC & Tirapegui, 2007. *J. Fisiologia da nutrição humana*. Aspectos básicos, aplicados e funcionais. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 565pp.
- Barnes PJ, Chung KF & Page CP, 1998. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol Rev* 50: 515-596.
- Bhaskar VH & Mohite PB, 2010. Design, Synthesis, Characterization And Biological Evaluation Of Some Novel 1, 5 Disubstituted Tetrazole As Potential Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials* 2(4): 231-237.
- Bogdan C, 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol* 2: 907-916.
- Bogers RJ, Craker LE & Lange D, 2006. *Medicinal and Aromatic Plants*, 261-273.
- Borges PAV, Cunha R, Gabriel R, Martins AF, Silva L & Vieira V, 2005. *A list of the terrestrial fauna (Mollusca and Arthropoda) and flora (Bryophyta, Pteridophyta and Spermatophyta) from the Azores*. Direcção Regional do Ambiente and Universidade dos Açores, Horta, Angra do Heroísmo and Ponta Delgada, 317 pp.
- Botting RM, 2006. Inhibitors of Cyclooxygenases: Mechanisms, Selectivity And Uses, *Journal Of Physiology And Pharmacology* 57(5): 113-124.
- Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T & Gugliucci A, 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of Ethnopharmacology* 136: 378– 384.
- Braga T & Pontes G, 2005. Plantas usadas na Medicina Popular. Amigos dos Açores - Associação ecológica, Açores, 48 pp.

- Brossi A, 1988. *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, Volume 32, Academic Press Inc, EUA. 454 pp.
- Burnett BP, Jia Q, Zhao Y & Levy RM, 2007. Medicinal Extract of *Scutellaria baicalensis* and *Acacia catechu* Acts as a Dual Inhibitor of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase to Reduce Inflammation. *Med Food* 10 (3): 442–451.
- Butovich IA & Lukyanova SM, 2008. Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenases by linoleyl hydroxamic acid: comparative in vitro studies. *Journal of Lipid Research*, 49: 1284-1294.
- Campos MG, 2005. Capítulo 13: Flavonóides. In : Cunha AP (coord), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 237-290. 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 670 pp.
- Calixto JB, Otuki MF & Santos ARS, 2003. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid Pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor kB (NF- kB). *Planta Med* 69: 973-983.
- Charlier C & Michaux C, 2003. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* 38: 645-659.
- Charo IF & Taub R, 2011. Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 365-376.
- Chen C-H, Chan H-C, Chu Y-T, Ho H-Y, Chen P-Y, Lee T-H & Lee C-K, 2009. Antioxidant Activity of Some Plant Extracts Towards Xanthine Oxidase, Lipoxygenase and Tyrosinase. *Molecules* 14: 2947-2958.
- Chopade AR, Somade PM & Sayyad FJ, 2012. Membrane Stabilizing Activity and Protein Denaturation: A Possible Mechanism of Action for the Anti-Inflammatory Activity of *Phyllanthus amarus*. *JKIMSU*, 1(1): 67-72.
- Colpo G, Trevisol F, Teixeira AM, Fachineto R, Pereira RP, Athayde ML, Rocha JB & Burger ME, 2007. *Ilex paraguariensis* has Antioxidant Potential and Attenuates Haloperidol-induced Orofacial and Memory Dysfunction in Rats Dyskinesia, *Neurotoxicity Research*, 12(3):171-180.
- Corsépius Y, 1997. *Algumas Plantas Medicinais dos Açores*, 2ª edição, Fernando Dimas Ramos Lda, Angra do Heroísmo, 100 pp.
- Crowley LV, 2010. *Essentials Of Human Disease*. Jones and Bartlett Publishers, Inc, Mississauga, Ontario, 554 pp.

- Chu Y-F, Chen Y, Brown PH, Lyle BJ, Black RM, Cheng IH, Ou B & Prior RL, 2012. Bioactivities of crude caffeine: Antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibition, and enhanced glucose uptake. *Food Chem* 131: 564-568.
- Cunha AP & Roque OR, 2005a. Capítulo 10 - Compostos fenólicos: características e origem biossintética. In: Cunha AP (coord), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 211-216. 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 670 pp.
- Cunha AP & Roque OR, 2005b. Capítulo 11 – Ácidos fenólicos, fenóis e seus derivados. In: Cunha AP (coord), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp.217-224. 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 670 pp.
- Cunha AP & Roque OR, 2005c. Capítulo 20 - Esteróis e triterpenos. In: Cunha AP (coord), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 433-476. 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 670 pp.
- Cunha AP, Salgueiro L & Roque OR, 2005. Capítulo 22 – Alcalóides – Aspectos gerais. In: Cunha AP (coord), *Farmacognosia e Fitoquímica*, pp. 485-494. 1ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 670 pp.
- Cunha AP, Silva AP & Roque OR, 2006. *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*, 2ª ed, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 702 pp.
- Dobrian AD, Lieb DC, Cole BK, Taylor-Fishwick DA, Chakrabarti SK & Nadler JL., 2011. Functional and pathological roles of the 12- and 15-lipoxygenases. *Prog Lipid Res.*, 50(1): 115–131.
- Dray A, 1995. Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia* 75: 125-131.
- Drug Development Technology, 2004. Disponível em <<http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/licofelone/>> Último acesso 11 de Outubro de 2012.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB & Lipsky PE, 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12:1063–1073.
- Dugowson CE & Gnanashanmugam P, 2006. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, *Phys Med Rehabil Clin N Am* 17: 347–354.
- Fan S-Y, Zeng H-W, Pei Y-H, Li L, Ye J, Pan Y-X, Zhang J-G, Yuan X & Zhang W-D, 2012. The anti-inflammatory activities of an extract and

- compounds isolated from *Platyclusus orientalis* (Linnaeus) Franco *in vitro* and *ex vivo*. *Journal of Ethnopharmacology* 141(2): 647-652.
- Favacho HAS, 2009. Caracterização Fitoquímica e Avaliação da Atividade Anti-Inflamatória e Antinociceptiva do Óleo Fixo de *Euterpe Oleracea* Mart. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Brasil, 79 pp.
 - Feltenmark S, Gautam N, Brunnström Å, Griffiths W, Backman L, Edenius C, Lindbom L, Björkholm M and Claesson H-E, 2008. Eoxins are proinflammatory arachidonic acid metabolites produced via the 15-lipoxygenase-1 pathway in human eosinophils and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(2): 680-5.
 - Fernandes, 1947. *Boletim da Sociedade Broteriana*. Vol. XXI, 2ª série, Tip. Alcobacense, Alcobaca.
 - Frum Y, 2006. *In vitro* 5-lipoxygenase and anti-oxidant activities of South African medicinal plants commonly used topically for skin diseases. Dissertação (mestrado) - University of the Witwatersrand, Johannesburg. 180 pp.
 - Gambaro G, 2002. Strategies to safely interfere with prostanoid activity while avoiding adverse renal effects: could COX-2 and COX-LOX dual inhibition be the answer? *Nephrol Dial Transplant*. 17(7):1159-62.
 - Garg S, Talwar GP & Upadhyay SN, 1998. Immunocontraceptive activity guided fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 60: 235–246.
 - Goossens L, Pommery N & Hélichart JP, 2007. COX-2/5-LOX dual acting anti inflammatory drugs in cancer chemotherapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 7: 283–296.
 - Govindappa M, Naga Sravya S, Poojashri MN, Sadananda TS, Chandrappa CP, Santoyo G, Sharanappa P & Anil Kumar NV, 2011. Antimicrobial, antioxidant and *in vitro* anti-inflammatory activity and phytochemical screening of water extract of *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. *J. Med. Plants Res.* 5(24): 5718-5729.
 - Harizi H, Corcuff J, Gualde N, 2008. Arachidonic-acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 14: 461-469.
 - Heck CI & De Mejia EG, 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A Comprehensive Review on Chemistry, Health Implications, and Technological Considerations. *Journal of Food Science*, 72(9): 138-151.

- Jäggi R, Würgler U, Grandjean F & M.Weiser, 2004. Dual inhibition of 5-lipoxygenase/cyclooxygenase by a reconstituted homeopathic remedy; possible explanation for clinical efficacy and favourable gastrointestinal tolerability, *Inflamm. res.* 53: 150–157.
- Kang NJ, Lee KW, Shin BJ, Jung SK, Hwang MK, Bode AM, Heo YS, Lee HJ, Dong Z, 2009. Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits Fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30(2): 321-30.
- Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, Okada S, Tateno K, Moriya J, Yokoyama M, Nojima A, Yoshimura M, Egashira K, Aburatani H, Komuro I, 2009. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J. Exp. Med.* 206(7): 1565-1574.
- Kessenbrock K, Dau T & Jenne DE, 2011. Tailor-made inflammation: how neutrophil serine proteases modulate the inflammatory response. *J Mol Med* 89:23–28.
- Kumar A, Ilavarasan R, Jayachandran T, Decaraman M & Aravindhan P, 2009. Phytochemicals Investigation on a Tropical Plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. *Pakistan Journal of Nutrition* 8 (1): 83-85.
- Kusmartsev S, 2012. Enhanced 15-lipoxygenase activity and elevated eicosanoid production in kidney tumor microenvironment contribute to the inflammation and immune suppression. *OncoImmunology* 1:2, 249–251.
- Leelaprakash G & Dass S, 2011. *In Vitro* Anti-Inflammatory Activity Of Methanol Extract Of *Enicostemma Axillare*, *Int. J. Drug Dev. & Res.*, 3 (3): 189-196.
- Li RW, Lin GD, Myers SP & Leach DN, 2003. Anti-inflammatory activity of Chinese medicinal vine plants. *Journal of Ethnopharmacology* 85: 61–67.
- Li RW, Lin GD, Leach DN, Waterman PG & Myers SP, 2006. Inhibition of COXs and 5-LOX and activation of PPARs by Australian *Clematis* species (Ranunculaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 104: 138–143.
- Liu C, Xu D, Liu L, Schain F, Brunnström A, Björkholm M, Claesson HE, Sjöberg J, 2009. 15-Lipoxygenase-1 induces expression and release of

- chemokines in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297(1): 196-203.
- Lobo AM & Lourenço AM, 2007. *Biossíntese de produtos naturais*. IST Press, Lisboa, 272 pp.
 - Macmicking, J, Xie Q & Nathan C, 1997. Nitric Oxide And Macrophage Function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.
 - Magnusson LU, Lundqvist A, Karlsson MN, Skálén K, Levin M, Wiklund O, Borén J, Hultén LM, 2012. *PLOS ONE* 7(8): e43142.
 - Makkar HPS, Siddhuraju P & Becker K, 2007. *Plant Secondary Metabolites*. Humana Press, New Jersey, 130 pp.
 - Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P & Pelletier J-P, 2003. Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* 62:501-509.
 - Masresha B, Makonnen E & Debella A, 2012. *In vivo* anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 142: 201-205.
 - Medzhitov R, 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454: 428-435.
 - Moss GP, 1989. "Nomenclature of Steroids (Recommendations 1989)". *Pure & Appl. Chem.* 61 (10): 1783-1822.
 - Mueller M, Hobiger S & Jungbauer A, 2010. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. *Food Chemistry* 122: 987–996.
 - Napoli C, Crimi E, Williams-Ignarro S, de Nigris F, Ignarro LJ, 2010. Nitric Oxide, Oxidative Stress, Immune Response and Critical Care. In: Ignarro LJ (ed), *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*, 2nd edition, Academic Press, USA, pp.755-772.
 - Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, Ifuku M, Kosai Y, Wang B, Nolte C, Aoki S, Kettenmann H & Wada K, 2007. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of proinflammatory cytokine release from activated microglia. *J Neurochem.* 101: 397-410.
 - Ohtsu, H, 2008. Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: The Role of Histamine in Immunological and Cardiovascular Disease and the Transporting

- System of Histamine in the Cell. *Journal of Pharmacological Sciences* 106: 347- 353.
- Okoye FBC & Osadebe PO, 2010. A new anti-inflammatory flavonol glycoside from *Alchornea floribunda* leaves. *Natural Product Research* 24 (3): 266-273.
 - Pham CTN, 2008. Neutrophil serine proteases fine-tune the inflammatory response. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(6-7): 1317-1333.
 - Phung DT, 2008. Regulation of prostanoid effects in whole blood: immediate-early anti-inflammatory effects of prostaglandin E2. Dissertação (Mestrado) - University of Tromsø, Tromsø, Norway, 94 pp.
 - Plazonić A, Bucař F, Maleš Ž, Mornař A, Nigović B & Kujundžić N, 2009. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpus* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules* 14: 2466-2490.
 - Pontes G & Braga T, 2006. Plantas dos Açores, 2ª edição. Amigos dos Açores – Associação ecológica, Açores, 63 pp.
 - Puangpraphant S & Mejia EG, 2009. Saponins in Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and Quercetin Synergistically Inhibit iNOS and COX-2 in Lipopolysaccharide-Induced Macrophages through NFκB Pathways. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8873-8883.
 - Puangpraphant S, Berhow MA & Mejia EG, 2011. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells *in vitro*. *Food Chemistry* 125: 1171-1178.
 - Puglia C, Santagati NA, Bonina F, Trombetta D, Cristani M, Speciale A & Saija A, 2006. Protective effect of Mediterranean fish oil extracts on heat-induced denaturation of albumin. *J Pharm Pharmacol.* 58(10):1411-3.
 - Rao PPN & Knaus EE, 2008. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond, *J Pharm Pharmaceut Sci* 11 (2): 81s-110s.
 - Rao PPN, Kabir SN & Mohamed T, 2010. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development, *Pharmaceuticals* 3: 1530-1549.

- Redington AE, 2006. Modulation of nitric oxide pathways: Therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharmacol* 533: 263-276.
- Reddy MVR, Billa VK, Pallela VR, Mallireddigari MR, Boominathan R, Gabriel JL & Reddy EP, 2008. Design, synthesis, and biological evaluation of 1-(4-sulfamylphenyl)-3-trifluoromethyl-5-indolyl pyrazolines as cyclooxygenase-2 (COX-2) and lipoxygenase (LOX) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 3907-3916.
- Ricciotti E & FitzGerald GA, 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 986-1000.
- Roome T, 2007. Anti-inflammatory activity of *Aegiceras corniculatum* and its mechanism of action using *in vivo* and *in vitro* systems. Dissertação (Doutoramento) - University of Karachi, Pakistan. 364 pp.
- Sadik CD, Sies H & Schewe T, 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol.* 65(5): 773-81.
- Saeed MK, Deng Y, Dai R, Li W, Yu Y & Iqbal Z, 2010. Appraisal of antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and fractions from the leaves of *Torreya grandis* Fort Ex. Lindl. *Journal of Ethnopharmacology* 127: 414-418.
- Sakat S, Juvekar AR & Gambhire MN, 2010. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *Int. J. Pharm. Pharmacol. Sci.*, 2(1): 146-155.
- Saso L, Valentini G, Casini ML, Mattei E, Braghiroli L, Mozzanti G, Panzironi C, Grippa E & Silvestrini B, 1999. Inhibition of protein denaturation by fatty acids, bile salts and other natural substances: a new hypothesis for the mechanism of action of fish oil in rheumatic diseases. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 89-99.
- Sayers D, 2010. *Azores*, 4th edition, Bradt Travel Guides, EUA, 266 pp.
- Schäfer H, 2005. *Flora of the Azores: a field guide*, 2nd edition. Margraf Publishers. Weikersheim, Alemanha, 346 pp.
- Scott LA, 1993. Diffusion Across a Sheep Red Blood Cell Membrane. Pages 115-140, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 14 (C. A. Goldman,

- Editor). Proceedings of the 14th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 240 pp.
- Serhan CN, Ward PA & Gilroy DW, 2010. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, EUA, 473 pp.
 - Singh A, Malhotra S, Subban R, 2008. Anti-inflammatory and analgesic agents from Indian medicinal plants. *Int J Integr Biol* 3: 57-72.
 - Shah BN, Seth AK & Maheshwari, 2011. A Review on Medicinal Plants as a Source of Anti-inflammatory Agents. *Research Journal of Medicinal Plant* 5(2): 101-105.
 - Shinde UA, Phadke AS, Nari AM, Mungantiwar AA, Dikshit VJ & Saraf MN, 1999. Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. *Fitoterapia* 70: 251-257.
 - Tortora GJ & Derrickson B, 2009. *Principles of Anatomy and Physiology*. 12th edition. John Wiley & Sons, Inc, EUA, 1280 pp.
 - Trowbridge HO & Emling RC, 1997. *Inflammation: A Review of the Process*. 5th edition. Quintessence Publishing Co, Inc., Carol Stream, Illinois, 236 pp.
 - Viornery L, Saliba C, Daskiewicz JB, Bayet C, Comte G, Fenet B, Gutierrez G & Denis Barron, 2000. Phenylpropanoids from *Umbilicus pendulinus*, *Chem. Pharm. Bull.* 48(11): 1768—1770.
 - Wagner H & Bladt S, 2001. *Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd edition. Germany, Springer, 385 pp.
 - Walther M, Holzhütter H-G, Kuban RJ, Wiesner R, Rathmann J & Kühn H, 1999. *Molecular Pharmacology*, 56: 196–203.
 - Wang J-R, Zhou H, Jiang Z-H, Wong YF & Liu L, 2008. *In Vivo* Anti-inflammatory and Analgesic Activities of a Purified Saponin Fraction Derived from the Root of *Ilex pubescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(4): 643-650.
 - Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA & Vane JR, 1999. Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: A full *in vitro* analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7563-7568.
 - Wiese LPL, 2008. Avaliação de Atividade Antioxidante e Antiinflamatória de Extrato e Frações de *Alternanthera Tenella* Colla. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 79 pp.

- White M, 1999. Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol* 103: 378-381.
- Wu M-Y, Lin T-H, Chiu Y-C, Liou H-C, Yang R-S, Fu1 W-M, 2012. Involvement of 15-lipoxygenase in the inflammatory arthritis, *Journal of Cellular Biochemistry*, 113 (7): 2279–2289.
- Yamamoto Y, Otani S, Hirai H, Nagata K, Aritake K, Urade Y, Narumiya S, Yokozeki H, Nakamura M & Satoh T, 2011. Dual Functions of Prostaglandin D₂ in Murine Contact Hypersensitivity via DP and CRTH₂. *Am J Pathol.* 179(1): 302–314.
- Yen G-C, Lai H-H & Chou H-Y, 2001. Nitric oxide-scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chemistry* 74: 471-478.
- Yoganandam GP, K.Ilango & De S, 2010. Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punica granatum* L.(Lythraceae). *International Journal of PharmTech Research*, 2(2): 1260-1263.
- Zhang Y, Shi G & Zhao F, 2010. Hydrolysis of casein catalyzed by papain in n-propanol/NaCl two-phase system. *Enzyme Microb. Technol.* 46: 438-443.

ANEXOS

ANEXO I - REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA

Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) (Wagner *et al.*, 2001)

A solução foi preparada pela dissolução de 0,10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.

Cloreto de Ferro III 2% (m/v) (Wagner *et al.*, 2001)

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.

Reagente de Liebermann-Burchard (Wagner *et al.*, 2001)

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

Reagente de Wagner (Brossi, 1988)

O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

ANEXO II - INIBIÇÃO DA DESNATURAÇÃO DA ALBUMINA

Um dos métodos realizados para avaliar a actividade anti-inflamatória baseia-se na desnaturação proteica provocada pela temperatura elevada. O protocolo apresentado a seguir está de acordo com o método descrito por Puglia *et al.* (2006) e Saso *et al.* (1999), com algumas modificações.

1 - Dissolver a amostra/padrão (ácido acetilsalicílico ou outro) numa quantidade mínima de dimetil formamida (DMF) e diluir em 0,066 M tampão fosfato pH 5,3 a 25°C, de modo ficarem à concentração de 0,5 mg/mL. A concentração final de DMF em todas as soluções deve ser inferior a 2,5%;

2 - Misturar a amostra/padrão com 0,08% BSA no mesmo tampão na proporção de 1:1. No caso do controlo adicionar só tampão e BSA;

3- Ler a absorvância a 595 nm no tempo 0 e deixar as amostras a incubar durante 15 minutos a $27^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$;

4 - Incubar as amostras à temperatura de $70^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos e ler novamente a absorvância a 595 nm;

5 - Realizar o procedimento em duplicado/triplicado para todas as amostras. A percentagem de inibição de desnaturação da albumina é calculada como se segue:

$$\% \text{ inibição desnaturação de BSA} = \left[\frac{1 - (A_{x,70^{\circ}\text{C}} - A_{0,22^{\circ}\text{C}})}{(A_{0,70^{\circ}\text{C}} - A_{0,22^{\circ}\text{C}})} \right] \times 100$$

Em que $A_{x,70^{\circ}\text{C}}$ é a absorvância a 595 nm da solução de BSA aquecida na presença de amostra/padrão (X); $A_{0,22^{\circ}\text{C}}$ e $A_{0,70^{\circ}\text{C}}$ correspondem às absorvâncias do controlo negativo (solução com BSA) antes e após aquecimento, respectivamente.

ANEXO III - TESTE DE ESTABILIDADE DA MEMBRANA

A membrana dos eritrócitos é análoga à membrana lisossomal e a sua estabilização indica que a amostra pode também estabilizar as membranas lisossomais, prevenindo a libertação de constituintes lisossomais de neutrófilos activados, como enzimas bactericidas e proteases (Leelaprakash & Dass, 2011; Sakat *et al.*, 2010).

O ensaio de determinação da estabilidade da membrana é realizado de acordo com o previamente descrito (Govindappa *et al.*, 2011; Shinde *et al.*, 1999), com pequenas modificações.

Preparação da suspensão de eritrócitos

- 1 - Recolher o sangue total de suíno heparinizado;
- 2 - Transferir o sangue para tubos de centrífuga e centrifugar a 1000 g durante 10 minutos. Descartar o sobrenadante de modo a ficar só com a porção de eritrócitos;
- 3 - Lavar a porção de eritrócitos três vezes com solução salina normal (0,9 % m/v);
- 4 - Diluir a porção de eritrócitos com solução salina normal de modo a ficar a 10% (v/v).

Avaliação da hemólise induzida por calor

- 1 - Dissolver a amostra/padrão (ácido acetilsalicílico ou outro) em solução salina normal de modo a ficarem à concentração de 0,2; 0,10 e 0,05 mg/mL;
- 2 - A mistura de reacção (3 mL) consiste de 2 mL da amostra/padrão (0,05; 0,10 e 0,2 mg/mL) e 1 mL da suspensão de eritrócitos a 10%;
- 3 - No tubo controlo, adicionar solução salina em vez da amostra/padrão;
- 4 - Incubar os tubos de centrífuga com a reacção num banho a 56°C durante 30 minutos. Após a incubação, arrefecer os tubos com água tépida.

5 - Centrifugar a mistura de reacção a 800 g durante 5 minutos e ler a absorvância do sobrenadante a 560 nm.

6 - Realizar o procedimento em duplicado/triplicado para todas as amostras. A percentagem de estabilização da membrana ou inibição da hemólise é calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ estabilização da membrana} = (100 - (\text{Abs}_A/\text{Abs}_C)) \times 100$$

Onde Abs_A corresponde à absorvância da amostra a 560 nm e Abs_C representa a absorvância do controlo a 560 nm.

ANEXO IV - INIBIÇÃO DA ACÇÃO DA PROTEASE TRIPSINA

O teste é realizado de acordo com o método modificado de Sakat *et al.* (2010) e Govindappa *et al.* (2011), com algumas modificações. Este ensaio monitoriza o grau de hidrólise da caseína pela enzima tripsina.

1 - Misturar 1 mL de tampão 20 mM Tris HCl (pH 7,4) e 1 mL da amostra/padrão (ácido acetilsalicílico ou outro), dissolvidos numa quantidade mínima de DMF (< 2,5%) e diluído com tampão, a testar a diferentes concentrações (0,06 – 1 mg/mL); o tubo controlo é preparado pela adição de 2 mL de tampão;

2 - Preparar solução de tripsina a 2 mg/mL em tampão 20 mM Tris HCl (pH 7,4);

3 - Adicionar 60 µL de tripsina à mistura de reacção (concentração final de enzima é 0,06 mg/mL) e incubar a 37°C durante 5 minutos;

4 - Adicionar 1 mL de 0,8% de caseína (m/v) e incubar novamente a mistura durante 20 minutos à mesma temperatura.

5 - Ao fim dos 20 minutos, adicionar 1 mL de ácido perclórico 70% de modo a parar a reacção.

6 - Centrifugar a suspensão turva durante 10 minutos a 13000 g e ler a absorvância do sobrenadante a 280 nm contra o tampão que serve como branco.

7 - Realizar o procedimento em duplicado/triplicado para todas as amostras. A actividade de inibição da tripsina é avaliada através da determinação do IC₅₀ (mg/mL) de todas as amostras obtido pela interpolação da regressão linear Concentração VS Abs a 280 nm. A percentagem de inibição da protease é calculada como se segue:

$$\% \text{ Inibição da protease} = (Abs_C - Abs_A / Abs_C) \times 100$$

Em que Abs_A representa a absorvância da amostra (amostra + enzima + caseína) a 280 nm e Abs_C corresponde à absorvância do controlo (enzima + caseína) a 280 nm.

ANEXO V - INIBIÇÃO DAS ENZIMAS CICLOXIGENASE 1 E 2

A inibição das cicloxigenases, COX-1 e COX-2, é determinada com o kit *COX Inhibitor Screening Assay* da *Cayman Chemical Co.*, nº 560131, de acordo com o protocolo do fabricante.

Material fornecido com o kit

- Anti-soro de prostaglandinas
- *Tracer* de prostaglandinas
- Padrão de prostaglandinas
- Tampão EIA concentrado (10X)
- Tampão de lavagem concentrado (400X)
- Polissorbato 20
- Microplaca de 96 poços revestida com anticorpos monoclonais de rato
- Cobertura de microplaca
- Reagente de *Ellman*
- Tampão de reacção (10X)
- COX-1
- COX-2
- Heme
- Ácido araquidónico
- Hidróxido de potássio
- Ácido clorídrico
- Cloreto de estanho (II)

Material necessário não fornecido

- Água ultra-pura (ex: água Mili-Q)
- Leitor de microplacas que permita a leitura 405-420 nm
- Dispensador automático

I – Reacção da cicloxigenase

Preparação dos reagentes

1 – Tampão de reacção (10X)

Diluir 5 mL de tampão de reacção concentrado (10X) com 45 mL de água ultra-pura. Este tampão de reacção preparado (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, contendo 5 mM de EDTA e 2 mM de fenol) é usado nas reacções COX e na diluição do heme. Quando armazenado à temperatura ambiente, este tampão diluído é estável por pelo menos um mês. Equilibrar o tampão diluído a 37°C antes de usar nas reacções COX.

2 – Enzimas COX-1 e COX-2

As enzimas COX devem ser guardadas em frascos mais pequenos a -80°C, de modo a evitar o congelamento e descongelamento frequentes.

3 - Heme

A solução de heme está dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO). Diluir 100 µL de heme com 400 µL de tampão de reacção 1X antes de usar. O heme diluído é estável durante 12 horas à temperatura ambiente.

4 – Ácido araquidónico

O ácido araquidónico está dissolvido em etanol. Transferir 50 µL do substrato fornecido para outro frasco e adicionar de hidróxido de potássio 0,1 M, agitar, e diluir com 400 µL de água ultra-pura para obter uma concentração final de 10 mM. Usar a solução de ácido araquidónico preparada em uma hora.

5 – Hidróxido de potássio

A solução de hidróxido de potássio está à concentração de 0,1 M e pronta a usar.

6 – Ácido clorídrico

Este frasco contém 1 M de ácido clorídrico (HCl). Diluir 500 µL com 4,5 mL de água ultra-pura de modo a ficar à concentração de 0,1 M. Este HCl diluído está pronto a usar para preparar a solução de cloreto de estanho saturado. As duas soluções de HCl (1 M e 0,1 M) são estáveis durante um mês à temperatura ambiente.

7 – Cloreto de estanho (II)

Este frasco contém cloreto de estanho. Adicionar 5 mL de 0,1 M de HCl e agitar a solução de modo a ficar saturada (esta solução saturada ficará turva). Esta solução é estável durante 8 horas à temperatura ambiente. Se não usar todo o conteúdo de cloreto de estanho, pesar 125 mg de cloreto de estanho para outro frasco e adicionar 2,5 mL de 0,1 M de HCl.

Procedimento da reacção da cicloxigenase

Usar o tampão de reacção 1X nas reacções e equilibrar a 37°C antes de usar.

1 - Tubos 100% actividade inicial da COX – Adicionar 950 µL de tampão de reacção, 10 µL de heme, 10 µL de COX (1 ou 2) e 20 µL de tampão/solvente a dois tubos de ensaio. Agitar a mistura de reacção.

2 - Tubos Inibidor COX – Adicionar 950 µL de tampão de reacção 10 µL de heme, 10 µL de COX (1 ou 2) e 20 µL do inibidor dissolvido em tampão/solvente¹ a seis tubos de ensaio. Agitar a mistura de reacção.

3 – Incubar os tubos durante 10 minutos a 37°C. Nota: A incubação das enzimas com o inibidor pode ser entre 10 a 20 minutos sem que afecte a estabilidade da enzima mas o tempo de incubação deve ser exactamente igual para todas as amostras.

4 – Iniciar a reacção pela adição de 10 µL de ácido araquidónico a todos os tubos. Agitar e incubar mais 2 minutos a 37°C.

5 – Adicionar 50 µL de 1 M HCl a cada tudo de modo a parar a catálise enzimática. Remover os tubos do banho, adicionar 100 µL da solução saturada de cloreto de estanho a cada tubo e agitar. Incubar mais 5 minutos à temperatura ambiente. A mistura de reacção deverá ficar turva.

6 – As prostaglandinas serão quantificadas pelo EIA. Proceder ao procedimento do EIA. As reacções são estáveis durante uma semana a 0-4°C se bem seladas.

¹ O inibidor pode ser dissolvido em metanol, DMSO, etanol ou em tampão de reacção 1X. O volume a adicionar do inibidor não deve ser superior a 20 µL.

II – Reacção do EIA

Preparação dos reagentes

A água utilizada para preparar todos os reagentes do EIA deve ser ultra-pura. Guardar os tampões diluídos a 4°C; são estáveis durante dois meses.

1 – Tampão EIA

Diluir o conteúdo de um frasco com o tampão concentrado EIA (10X) em 90 mL de água ultra-pura. Passar primeiro o frasco por água ultra-pura de modo a remover sais que possam ter precipitado.

2 – Tampão de lavagem

Diluir o conteúdo de um frasco com o tampão de lavagem concentrado (400X) a um volume total de dois litros com água ultra-pura e adicionar 1 mL de polissorbato 20. Pode ser preparado um volume mais pequeno pela diluição de tampão de lavagem concentrado 1:400 e adicionar polissorbato 20 (0,5 mL/L de tampão de lavagem). O tampão diluído é estável durante 2 meses a 4°C.

3 – Padrão de prostaglandinas

Dissolver o padrão de prostaglandinas liofilizado em 1 mL de tampão EIA. A concentração desta solução padrão será de 10 ng/mL. Armazenar a 4°C; estável por aproximadamente seis semanas.

Obter 8 tubos e numerá-los de #1 até #8 (**Figura I**). Adicionar 800 µL de tampão EIA ao tubo #1 e 500 µL aos tubos #2-#8. Transferir 200 µL do padrão de prostaglandinas (10 ng/mL) ao tubo 1 e homogeneizar. Fazer a diluição seriada removendo 500 µL do tubo #1 para o tubo #2 e homogeneizar. Seguidamente, remover 500 µL do tubo #2 para o tubo #3 e homogeneizar. Repetir este processo para os tubos #4-#8. Estas soluções de padrão diluídas não devem ser armazenadas por mais de 24 horas. São estas amostras que permitem a construção da curva padrão de prostaglandinas.

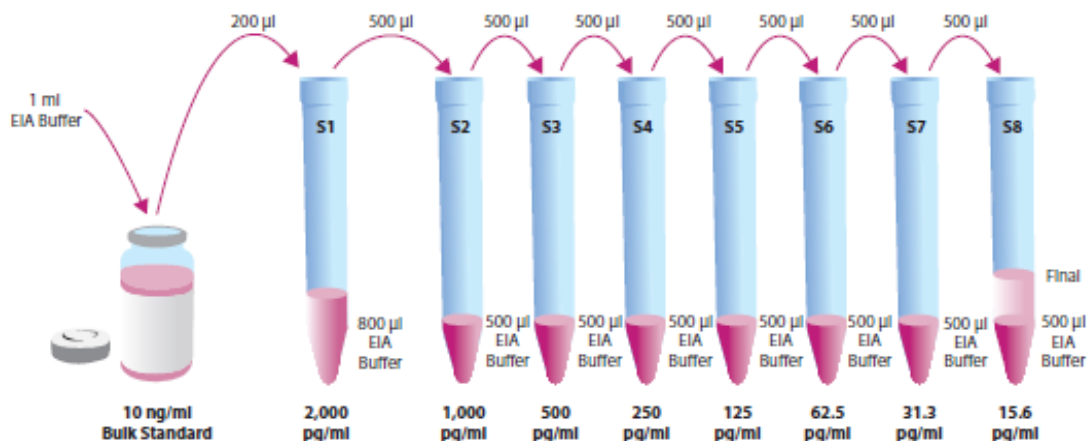


Figura I - Preparação dos padrões de prostaglandinas (adaptado de *Cayman Chemical Co.*, nº 560131).

4 – Tracer de prostaglandinas

Diluir o conteúdo do frasco de tracer de prostaglandinas com 6 mL de tampão EIA. Guardar a solução preparada a 4°C; estável durante duas semanas.

5 – Anti-soro de prostaglandinas

Diluir o conteúdo do frasco de anti-soro com 6 mL de tampão EIA. Guardar a solução preparada a 4°C; estável durante quatro semanas.

Reacções de diluição das COXs

1 - Amostras 100% actividade inicial da COX – Obter 2 tubos por amostra e numerá-los IA1 e IA2. Adicionar 990 µL de tampão EIA ao tubo IA1, adicionar 10 µL do tubo com 100% actividade inicial de COX-1 ou COX-2 e homogeneizar. Adicionar 950 µL de tampão EIA ao tubo IA2, transferir 50 µL do tubo IA1 para o tubo IA2 e homogeneizar. Usar o tubo IA2 na reacção na microplaca.

2 – Amostras Inibidor COX – Obter 2 tubos por amostra e numerá-los C1 e C2. Adicionar 990 µL de tampão EIA ao tubo C1, adicionar 10 µL do tubo com inibidor da COX-1 ou COX-2 e homogeneizar. Adicionar 950 µL de tampão EIA ao tubo C2, transferir 50 µL do tubo C1 para o tubo C2 e homogeneizar. Usar o tubo C2 na reacção na microplaca.

III – Reacção na microplaca (Figura II)

1 – Tampão EIA – Adicionar 100 µL do tampão EIA aos poços de ligação não-específica (NSB). Adicionar 50 µL de tampão EIA aos poços de ligação máxima (B₀).

2 – Padrão de prostaglandinas – Adicionar 50 µL do tubo #8 aos dois poços (S8). Adicionar 50 µL do tubo #7 aos dois poços seguintes. Continuar este processo para todos os tubos.

3 - Amostras 100% actividade inicial da COX – Adicionar 50 µL de amostra por poço (tubo IA2).

4 - Amostras Inibidor COX – Adicionar 50 µL de amostra por poço (tubo C2).

5 - Tracer de prostaglandinas – Adicionar 50 µL do *tracer* de prostaglandinas a todos os poços, excepto o de actividade total (TA) e os poços do branco (Blk).

6 - Anti-soro de prostaglandinas – Adicionar 50 µL de anti-soro de prostaglandinas a todos os poços, excepto o de actividade total (TA), o de ligação não-específica (NSB), e os poços do branco (Blk).

7 - Cobrir a microplaca e incubar durante 18 horas à temperatura ambiente em constante agitação.

8 - Ao fim da incubação, diluir o conteúdo de um frasco com reagente de Ellman com 20 mL de água ultra-pura. Usar o reagente no mesmo dia em que é preparado.

9 - Aspirar o conteúdo de todos os poços e lavar cinco vezes com o tampão de lavagem.

10 - Adicionar 200 µL do reagente de *Ellman* a todos os poços.

11 - Adicionar 5 µL do *tracer* aos poços de actividade total (TA).

12 - Cobrir a microplaca e incubar ao escuro durante 60-90 minutos, tempo óptimo de desenvolvimento da reacção. Este ensaio desenvolve-se quando os poços B_0 têm uma absorvância $\geq 0,30$ (subtraindo o branco).

13 - Após incubação, limpar a microplaca por baixo de modo a remover alguma sujidade.

14 - Ler a absorvância no comprimento de onda 405 – 420 nm. A absorvância deve ser lida periodicamente até aos poços B_0 obterem um mínimo de 0,30 de absorvância (subtraindo o branco). A microplaca deve ser lida quando a absorvância dos poços se encontra no intervalo 0,30 – 0,80 (subtraindo o branco). Quando a absorvância for superior a 1,50, lavar a microplaca, adicionar novo reagente de *Ellman* e deixar desenvolver a reacção novamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	IA2	IA2	H	H	H	H	H	H	H
B	Blk	S2	S2	IA2	IA2	H	H	H	H	H	H	H
C	NSB	S3	S3	H	H	H	H	H	H	H	H	H
D	NSB	S4	S4	H	H	H	H	H	H	H	H	H
E	B_0	S5	S5	H	H	H	H	H	H	H	H	H
F	B_0	S6	S6	H	H	H	H	H	H	H	H	H
G	B_0	S7	S7	H	H	H	H	H	H	H	H	H
H	TA	S8	S8	H	H	H	H	H	H	H	H	H

Figura II - Esquema proposto da preparação da microplaca do ensaio da cicloxigenase. **Blk** – branco; **NSB** – ligação não específica; **B_0** – ligação máxima; **TA** – actividade total; **S1-S8** – padrão de prostaglandinas 1-8; **IA2** – 100% actividade inicial; **H** – inibidor COX (C2) (adaptado de *Cayman Chemical Co.*, nº 560131).

Cálculos

A concentração final de prostaglandinas das amostras é calculada com o auxílio da folha de cálculo “EIA Double.xls” ou “EIA Triple.xls” disponível em <www.caymanchem.com>.

A inibição das enzimas COX-1/COX-2 é avaliada pelo cálculo da percentagem de inibição da produção de prostaglandinas segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição COX-1/COX-2} = \left[\frac{[\text{PGs}] \text{ A} - [\text{PGs}] \text{ B}}{[\text{PGs}] \text{ A}} \right] \times 100$$

Em que [PGs] A corresponde à concentração de prostaglandinas nos tubos de 100% de actividade inicial da enzima COX e [PGs] B corresponde à concentração de prostaglandinas nos tubos da amostra.

ANEXO VI - ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ENZIMA LIPOXIGENASE

A inibição da lipoxigenase foi avaliada com o kit *Lipoxygenase Inhibitor Screening Assay* da *Cayman Chemical Co.*, nº 760700, de acordo com o protocolo do fabricante.

Material fornecido com o kit

- Tampão de reacção (10X)
- Agente de revelação 1
- Agente de revelação 2
- Padrão 15-LOX
- Ácido araquidónico
- Ácido linoleico
- Hidróxido de potássio
- Microplaca de 96 poços
- Cobertura de microplaca

Material necessário não fornecido

- Água pura (ex: água bi-destilada e filtrada)
- Leitor de microplacas que permita a leitura 490-500 nm
- Dispensador automático

Preparação dos reagentes

1 – Tampão de reacção (10X)

Diluir 3 mL do tampão de reacção concentrado (10X) com 27 mL de água pura. O tampão de reacção diluído (0,1 M Tris-HCl, pH 7,4) quando guardado a 4°C é estável por, pelo menos, dois meses.

2 – Agente de revelação 1 e 2

Os reagentes estão prontos a usar.

3 – Cromógeno

Preparar o cromógeno pela adição de partes iguais do agente de desenvolvimento 1 e 2 e agitar. O volume de cromógeno a preparar deve ser dependente do número de poços a utilizar em cada ensaio. Usar o cromógeno em uma hora.

4 – Padrão 15-LOX

Uma solução de 15-LOX (soja) é fornecida como controlo positivo. Transferir 10 µL da enzima para outro frasco e diluir com 990 µL de tampão diluído antes de usar, guardar no gelo, e usar dentro de uma hora.

5 – Ácido araquidónico

Este frasco contém uma solução de ácido araquidónico em etanol e deve ser guardada a -20°C quando não utilizada. Transferir 25 µL deste substrato para outro frasco, adicionar 25 µL de hidróxido de potássio, agitar, e diluir com 950 µL de água pura de modo a ficar à concentração final de 1 mM. Usar o ácido araquidónico preparado em 30 minutos.

6 – Ácido linoleico

Este frasco contém uma solução de ácido linoleico em etanol e deve ser guardada a -20°C quando não utilizada. Transferir 25 µL deste substrato para outro frasco, adicionar 25 µL de hidróxido de potássio, agitar, e diluir com 950 µL de água pura de modo a ficar à concentração final de 1 mM. Usar o ácido linoleico preparado em 30 minutos. Nota: Pode-se usar o ácido araquidónico ou ácido linoleico no ensaio. Não é necessário utilizar os dois.

7 – Hidróxido de potássio

Este frasco contém 0,1 M de hidróxido de potássio. O reagente está pronto a usar.

Procedimento da reacção da lipoxigenase (Figura III)

1 –Branco – adicionar 100 µL do tampão de reacção (1X) a, pelo menos, dois poços.

2 – Controlo positivo (padrão 15-LOX) – adicionar 90 µL de 15-LOX e 10 µL de tampão de reacção (1X) a, pelo menos, dois poços.

3 – 100% de actividade inicial – adicionar 90 µL de 15-LOX e 10 µL de solvente (o mesmo solvente usado para dissolver o inibidor) a dois poços.

4 – Inibidor - adicionar 90 µL de 15-LOX e 10 µL do inibidor² a dois poços.

5 – Iniciar a reacção pela adição de 10 µL de substrato (ácido araquidónico ou ácido linoleico) a todos os poços.

6 – Colocar a microplaca a agitar por, pelo menos, 5 minutos.

7 – Adicionar cromógeno a todos os poços de modo a parar a catálise enzimática e desenvolver a reacção. Cobrir a microplaca e deixá-la a agitar durante 5 minutos.

8 – Retirar a cobertura e ler a absorvância a 490-500 nm.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
B	+	+	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
C	*	*	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
D	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
E	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
F	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
G	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
H	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45

Figura III - Esquema proposto da preparação da microplaca do ensaio da lipoxigenase. **B** – branco; + - controlo positivo; * - 100% actividade inicial; **1-45** – inibidor (adaptado de *Cayman Chemical Co.*, nº 760700).

² O inibidor pode ser dissolvido em metanol, DMSO, etanol ou em tampão de reacção 1X. O volume a adicionar do inibidor deve ser de 10 µL.

Cálculos

A percentagem de inibição da enzima 15-LOX é calculada com o auxílio da folha de cálculo “LISDouble.xls” ou “LISTriple.xls” disponível em <www.caymanchem.com>.

A determinação do efeito inibidor é avaliado de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição 15-LOX} = \left[\frac{A - B}{A} \right] \times 100$$

Em que A é a absorvância a 490-500 nm de 100% de actividade inicial da enzima LOX e B corresponde à absorvância a 490-500 nm da amostra.