

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

NATÁLIA RAMOS PACHECO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO
METANÓLICO DA *Cecropia pachystachya* Trécul (CECROPIACEAE)**

Juiz de Fora

2013

NATÁLIA RAMOS PACHECO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO
METANÓLICO DA *Cecropia pachystachya* Trécul (CECROPIACEAE)

Dissertação desenvolvida no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora durante o Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elita Scio Fontes

JUIZ DE FORA

2013

NATÁLIA RAMOS PACHECO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO DO EXTRATO
METANÓLICO DA *Cecropia pachystachya* Trécul (CECROPIACEAE)

Dissertação desenvolvida no Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora durante o Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elita Scio Fontes

EM 18 / 07 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Elita Scio Fontes

Prof^a Dr^a Maria Christina Marques Nogueira Castañon

Prof^a Dr^a Virgínia Ramos Pizziolo

AGRADECIMENTOS

A Deus, dono de todo conhecimento e sabedoria, por conceder essa conquista, por estender suas mãos nos momentos de desânimo e por me apresentar a pessoas tão especiais e auxiliadoras no decorrer de toda a caminhada.

Aos meus pais, Espedito e Marly, e a minha irmã, Cecília, por estarem sempre me esperando com abraços repletos de amor, compreensão e tranquilidade. Obrigada por acreditarem em meu potencial e me apoiarem na busca da realização de meus sonhos.

Ao Gabriel, que com muito amor esteve sempre ao meu lado tornando menores os obstáculos encontrados. Obrigada por acreditar nas minhas convicções e incentivá-las sempre.

Aos meus colegas de laboratório e de mestrado, por tornarem os dias de trabalho mais prazerosos. Especialmente ao Nicolás e a Ana Paula que me acolheram desde o início de braços abertos e nunca mediram esforços em me ajudar, e a Josi, Dani, Raquel e Jéssica pelos momentos de aprendizado e apoio nos experimentos, vocês foram peças fundamentais para o sucesso dessa jornada.

À minha orientadora Elita Scio, que com competência e entusiasmo ensinou-me os melhores caminhos a se trilhar na busca do conhecimento e do sucesso. Obrigada pela dedicação e pela atenção. Você sem dúvida é a pessoa mais importante nessa conquista.

À professora Maria Christina Marques Nogueira Castañon, pelas preciosas sugestões neste trabalho.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse projeto.

RESUMO

Cecropia pachystachya, também conhecida como embaúba, umbaúba, imbaúba, embaúva é utilizada na medicina popular para o tratamento de asma, tosse, hipertensão, bem como inflamação. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *C. pachystachya* (EMCP) e investigar os possíveis mecanismos envolvidos nessa atividade. Para isso, o edema de orelha provocado pela aplicação de óleo de cróton (aplicação simples e múltipla), ácido araquidônico, fenol, EPP e capsaicina em camundongos foi utilizado. As aplicações tópicas desses agentes irritantes foram feitas nas orelhas direitas dos animais que foram pré-tratados com uma mistura de acetona (controle), dexametasona ou indometacina (controle positivo) e EMCP. Os resultados indicaram que EMCP apresentou atividade anti-inflamatória tópica significativa reduzindo o edema causado pelo óleo de cróton (aplicação única e múltipla), ácido araquidônico, fenol e EPP. Porém o edema causado pela capsaicina não foi reduzido por EMCP. A análise histológica mostrou que EMCP também tem atividade anti-inflamatória na inflamação crônica. Os resultados obtidos sugerem que o EMCP possui atividade anti-inflamatória tópica e indicam que um dos seus mecanismos de ação envolve a inibição na via do AA. Outro fator importante é que EMCP atua provavelmente por mais de um mecanismo, visto que foi tão efetivo contra a resposta desencadeada pelo fenol, quanto contra a resposta desencadeada pelo TPA. E também pode estar exercendo sua ação por atuar sobre mediadores, como eficientemente demonstrado no modelo do EPP e pela sua ação antioxidante. Além disso, a ação demonstrada no processo crônico torna a *C. pachystachya* uma planta com potencial para ser utilizada no desenvolvimento de formulações dermocosméticas destinadas ao tratamento de diversas condições dermatológicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o mecanismo de ação pelo qual essa planta exerce seus efeitos, bem como estudos que comprovem a segurança do seu uso tópico em humanos.

Palavras-chave: *Cecropia pachystachya*, anti-inflamatório, inflamação, tópico

ABSTRACT

Cecropia pachystachya, also known as embaúba, umbaúba, imbaúba, embaúva is used in folk medicine for the treatment of asthma, cough, high blood pressure, as well as inflammation. Thus, the present study aimed to evaluate the topical anti-inflammatory effect of the methanol extract of *C. pachystachya* (EMCP) and to investigate the possible mechanisms involved in this activity. Ear edema provoked by the application of croton oil (single and multiple application), arachidonic acid, phenol, EPP and capsaicin to mice was used to evaluate the potential anti-inflammatory value of the topical use of EMCP. Topical applications of these irritants were made to the right ears of animals that were pre-treated with acetone (control), dexamethasone or indomethacin (positive control), and EMCP. Our results indicated that EMCP demonstrated significant topical anti-inflammatory activity reducing inflammation related to ear edema caused by croton oil (single and multiple application), arachidonic acid, phenol and EPP. However, EMCP did not significantly reduce the edema caused by capsaicin. Histological analysis showed that EMCP also has chronic anti-inflammatory activity. The results suggest that the EMCP has topical anti-inflammatory activity and indicate that one of its mechanisms of action involves the inhibition via the AA. Another important factor is that EMCP probably acts by more than one mechanism, since it was so effective against the response triggered by phenol, and against the response triggered by TPA. And can also be exerting its action by acting on mediators, as effectively demonstrated the EPP model and its antioxidant action. In addition, the demonstrated action in the process becomes chronic *C. pachystachya* a plant with potential to be used in the development of dermocosmetic formulations intended for the treatment of various dermatological conditions. However, additional studies are needed to confirm the mechanism of action by which this plant exerts its effects, as well as studies to prove the safety of its topical use in humans.

Keywords: *Cecropia pachystachya*, anti-inflammatory, inflammation, topical

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Cecropia pachystachya</i>.....	20
Figura 2 - Folhas e frutos da <i>Cecropia pachystachya</i>.....	21
Figura 3 - As primeiras manifestações locais da inflamação aguda comparadas com o tecido normal.....	24
Figura 4 - Representação do mecanismo de indução de adesão leucócito-endotélio na inflamação em resposta a um agente quimiotático.....	26
Figura 5 - Geração de metabólitos do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação.....	28
Figura 6 - Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (espessura da orelha) induzido pela aplicação simples de óleo de cróton em camundongos.....	40
Figura 7 - Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do ácido araquidônico em camundongos.....	41
Figura 8 - Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do fenol em camundongos.....	42
Figura 9 - Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação da capsaicina em camundongos.....	43
Figura 10 – Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do EPP em camundongos.....	44
Figura 11 - Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (espessura da orelha) induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos.....	45

Figura 12 - Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 μm e 400x, escala de 20 μm), 24 horas após aplicação única de óleo de cróton.....**46**

Figura 13 - Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 μm e 400x, escala de 20 μm), após aplicação múltipla de óleo de cróton.....**48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica semi quantitativa dos parâmetros da inflamação aguda induzida pela aplicação única de óleo de cróton.....**47**

Tabela 2 - Análise histológica semi quantitativa dos parâmetros da inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....**49**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma (s)

µL – microlitro (s)

µm – micrômetro (s)

AA - ácido araquidônico

a.C. – antes de Cristo

AINE - anti-inflamatórios não esteroidal

AP - proteína ativadora

C – Celsius

CGRP- peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – cicloxigenase

d.C.- depois de Cristo

DNA - ácido desoxirribonucleico

EMCP - extrato metanólico da *Cecropia pachystachya*

e.p.m. – Erro padrão da média

EPP - propiolato de feniletila

g – gramas

h – hora (s)

HETE - ácidos hidroxieicosatetraenoicos

HPETE - ácidos monohidroperoxido eicosatetraenoicos

ICAM - molécula de adesão intercelular

Ig – imunoglobulina

IκB - proteína inibitória-kB

IL – interleucina

INF – interferon

iNOS - óxido nítrico sintetase induzida

i.p. – intra-peritoneal

LOX – lipoxigenase

LT – leucotrienos

MAPK - proteínas quinases ativadas por mitógenos

mg – miligrama (s)

mm - milímetro (s)

mM – mili molar

mUI – mili unidades internacionais

MPO – mieloperoxidase

NF - fator nuclear

NF-kB - fator nuclear kappa B

NO - óxido nítrico

PAF - fator de ativação de plaquetas

PG – prostaglandina

PK - proteína quinase

PLA2 - fosfolipase A2

PMN – polimorfonucleares

ROS - espécies reativas de oxigênio

rpm - rotações por minuto

SP - substancia P

TNF – fator de necrose tumoral

TPA - 12-O tetradecanoilforbol acetato

TRPV1 - receptores vaniloides de potencial transitório tipo 1

TXA – tromboxana

UV – ultra-violeta

VCAM - molécula de adesão da célula vascular

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Uso de plantas na medicina popular.....	16
1.2 Plantas do gênero Cecropia.....	17
1.3 Espécie <i>Cecropia pachystachya</i>	19
1.4 Inflamação.....	22
1.4.1 Inflamação aguda.....	23
1.4.2 Inflamação crônica.....	30
1.4.3 Farmacologia da inflamação.....	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Coleta do material vegetal.....	35
3.2 Preparo do extrato.....	35
3.3 Animais.....	35
3.4 Protocolos Experimentais (Modelo de Edema de Orelha).....	35

3.4.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica única de óleo de cróton.....	36
3.4.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	36
3.4.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol.....	37
3.4.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	37
3.4.5 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de EPP (propiolato de feniletila).....	37
3.4.6 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	38
3.5 Análise histológica.....	38
3.6 Análise Estatística.....	39
4. RESULTADOS PRELIMINARES	40
4.1 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica única de óleo de cróton.....	40
4.2 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico.....	41
4.3 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol.....	42
4.4 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina.....	42
4.5 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de EPP	43

4.6 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	44
4.7 Análise histológica.....	45
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Uso de plantas na medicina popular

Em várias culturas, as plantas são utilizadas para fins medicinais no tratamento de diversas enfermidades. O vasto conhecimento sobre seu uso se deve, principalmente, à sabedoria popular (SIMÕES e MINGUZZI, 2011). Assim, tem-se como uma estratégia útil no desenvolvimento de fármacos provenientes de produtos naturais, a utilização do vasto conhecimento popular em relação ao uso medicinal de espécies vegetais. Essa informação permite nortear a química de produtos naturais na busca de novos agentes terapêuticos. Muitos dos medicamentos disponíveis hoje no mercado derivados de produtos naturais foram desenvolvidos a partir desta abordagem, denominada etnobotânica ou etnofarmacológica (CLARK, 2002). Esses fitomedicamentos foram muito utilizados até meados do século passado quando, com os avanços científicos, começaram a ser progressivamente substituídos por medicamentos sintéticos supostamente de melhor qualidade e fácil controle (TANAE et al., 2007). Posteriormente, o alto custo destes fármacos e os efeitos colaterais apresentados contribuíram para o ressurgimento da fitoterapia (SIMÕES e MINGUZZI, 2011).

Neste contexto, os produtos naturais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos, o que se deve às diversas substâncias químicas, não somente oriundas do metabolismo secundário vegetal, mas também de toxinas de animais e de microorganismos. A indústria pode encontrar nos produtos naturais novas estruturas químicas e, diante disso, desenvolver fármacos que serão possíveis alternativas terapêuticas mais eficazes para o tratamento ou prevenção de doenças (CALIXTO, 2005).

No que diz respeito a plantas já utilizadas na indústria cosmética, devido as suas propriedades anti-inflamatórias e/ou antioxidantes, temos um grande número de exemplos tais como a *Carapa guianensis* (Andiroba), *Camellia sinensis* (Chá verde), *Glycyrrhiza glabra* (Alcaçuz), *Matricaria recutita* (Camomila), *Calendula officinalis* (Calêndula), entre outras (BERNARDI, 2009).

Considerando o mercado representado pelas grandes indústrias farmacêuticas, nacionais e multinacionais, tem-se observado a ampliação da

fabricação de medicamentos naturais movido, principalmente, pelo apelo e valorização da natureza. Movimentando bilhões de dólares por ano, estas empresas têm buscado no Brasil, ou em países com capacidade produtiva semelhante, princípios, essências e formulações para a obtenção de medicamentos e vacinas. Os investimentos em pesquisa e desenvolvimento por parte das grandes indústrias farmacêuticas mundiais passaram de cerca de 2 bilhões de dólares na década de 1980, para mais de 40 bilhões de dólares atualmente (AGRIANUAL, 2002; CALIXTO E SIQUEIRA JR, 2008).

O Brasil é um país altamente privilegiado por apresentar um vasto território com uma grande biodiversidade. Além disso, o uso de plantas como meio curativo é muito utilizado pela população, apesar de muitas vezes serem empregadas de maneira equivocada e até mesmo prejudicial, já que muitas possuem princípios tóxicos e o seu uso indiscriminado pode causar sérios problemas (SOARES, 2002).

As substâncias biologicamente ativas presentes nas plantas são chamadas de metabólitos secundários ou especiais e são produzidos por rotas biossintéticas diversas cujas moléculas precursoras são os metabólitos primários, como exemplo, os carboidratos, proteínas e lipídeos, que são essenciais para as funções vitais da planta. Ao contrário dos metabólitos primários, os secundários são encontrados em concentrações relativamente baixas e somente em determinados grupos de plantas (POSER e MENTZ, 2000).

Esses produtos naturais provenientes de matéria-prima vegetal oferecem uma grande variedade de moléculas com enorme diversidade em suas atividades biológicas e em suas estruturas (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007). Portanto, é importante a investigação de espécies vegetais principalmente no que diz respeito à identificação de protótipos, cuja atividade farmacológica permita o desenvolvimento de novos fármacos (BORRIS, 1996). Esforços têm sido realizados com o intuito de promover modificações nas substâncias naturais a fim de se potencializar suas propriedades e minimizar seus efeitos colaterais e adversos (SCHULZ et al., 2002). No entanto, ainda existe um grande desafio dentro da química medicinal que é tornar um protótipo em um fármaco apropriado para o uso terapêutico (BORRIS, 1996).

Moléculas biologicamente ativas, derivadas de vegetais, são descobertas a cada dia, e tornam-se fármacos de grande importância na terapêutica atual, tais como o ácido salicílico, a atropina, a pilocarpina, a quinina, a camptotecina, a

artemisinina, o taxol, a digoxina e a morfina (LENTINI, 2000; RISHTON, 2008; VIEGAS JR et al. 2006).

1.2 Plantas do gênero *Cecropia*

A família Cecropiaceae ou Moraceae é constituída por seis gêneros, sendo um deles o gênero *Cecropia*, formado por aproximadamente 75 espécies (TANAE et al., 2007).

As espécies do gênero *Cecropia* são árvores pioneiras e apresentam-se largamente distribuídas na região Neotropical, principalmente em áreas úmidas entre o nível do mar e 2600 metros de altitude. Elas estão presentes do sul do México ao norte da Argentina (FRANCO-ROSSELLI, 1997) e cerca de 50% delas podem ser encontradas nas florestas andinas, mais concentradas no norte dos Andes, na Colômbia e Equador (ARAGÃO et al., 2010). Caracterizam-se por serem árvores perenifólias e heliófitas e seus frutos carnosos são apreciados por muitas espécies de aves e mamíferos, responsáveis pela dispersão de suas minúsculas sementes (LORENZI, 2002). No Brasil, situa-se principalmente no litoral do Nordeste, passando pelo Sudeste, Centro-Oeste e chegando até Santa Catarina. Está presente tanto na área de cerrados quanto na de florestas variadas e formações do complexo atlântico (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007).

Várias espécies do gênero *Cecropia* são utilizadas na medicina popular da América Latina, com variações na indicação terapêutica dependendo do país e das espécies empregadas (VENTURA, 2011).

No México, as embaúbas são utilizadas popularmente no tratamento do diabetes, tosse, diarreia, asma, obesidade, perturbações no fígado, verruga, hipertensão arterial e inflamação. Na Colômbia, são utilizadas no tratamento da doença de Parkinson e também nas doenças cardíacas como substituintes de plantas que contém digitálicos. Em Cuba praticamente todas as partes da planta são usadas, sendo as raízes para as afecções biliares, o látex é considerado corrosivo e adstringente, as cascas promovem redução do muco, as frutas são emolientes, e finalmente as folhas que são utilizadas para diminuição da dor, edema, asma,

perturbações hepáticas e para amenizar os sintomas da menstruação (WRIGHT et al., 2007).

No Brasil, cinco espécies do gênero são ocorrentes: *Cecropia glaziovii* Sneth, *C. hololeuca* Miq, *C. pachystachya* Trécul, *C. purpurascens* Berg e *C. sciadophylla* Mart. (BOCCHESI et al., 2008).

Alguns estudos farmacológicos realizados com a espécie *C. glaziovii* Sneth, indicaram que o extrato aquoso apresentou efeito broncodilatador, anti-hipertensivo e antidepressivo, provavelmente atribuídos às catequinas, procianidinas e flavonoides presentes nesse extrato. Em *C. obtusifolia* foi identificada a presença da flavona isoorientina e ácido clorogênico como prováveis compostos envolvidos no seu efeito hipoglicemiante (STANGE et al., 2009). Atividade hipoglicemiante aguda também foi relatada para *C. pachystachya* (ARAGÃO et al., 2010).

1.3 Espécie *Cecropia pachystachya*

Auguste Trécul em 1847 descreveu a espécie *Cecropia pachystachya* que tem como sinonímia *Cecropia adenopus* (SIMÕES e MINGUZZI, 2011). No Brasil, a espécie é conhecida por embaúba, umbaúba, imbaúba, embaúva, umbaúba-dobrejo, árvore-da-preguiça, umbaubeira, pau-de-lixia, umbaúba branca, entre outras (HERNÁNDEZ-TERRONES et al., 2007). Estas denominações provêm do termo “ambaíba”, que no tupi significa árvore oca, uma alusão aos caules ocos das espécies de *Cecropia*. Outros nomes populares de espécies desta família são: guarumo e yarumo na Colômbia e no Equador, yongol no Peru e yagrumo na Venezuela (LORENZI e SOUZA, 2001).

C. pachystachya são árvores silvestres com tronco de cor esbranquiçada, perenifólia, que ocorre desde o Rio Grande do Norte até Santa Catarina, nos cerrados, nas florestas estacionais e nas formações do complexo atlântico. Suas árvores apresentam uma altura que pode variar de 5 a 10m, e os seus troncos apresentam um diâmetro variando de 15 a 20 cm, sendo ramificado apenas na região superior (Figura 1) (SIMÕES e MINGUZZI, 2011).



Figura 1. *Cecropia pachystachya*. Fonte:
<http://www.arvores.brasil.nom.br/new/embauba/index.htm>

Ocorrem abundantemente na vegetação secundária das matas úmidas do litoral e das serras do Sul e Sudeste brasileiro (LORENZI e SOUZA, 2001). Florescem de setembro a outubro e frutificam de maio a junho (VENTURA, 2011). O desenvolvimento das plantas no campo é rápido. Os frutos são procurados pelas aves e servem de alimento a várias espécies animais dentre elas os peixes, como pacu, piracanjuba e outros (BALBACHAS, 1960).

As características de suas folhas são simples, palmatífidas, com incisões que às vezes atingem o pecíolo, formando de 9 a 13 segmentos; face superior áspera e a inferior com presença de pelos esbranquiçados; pecíolo piloso de 10 a 55 cm de comprimento. Trata-se de uma espécie dioica com inflorescências masculinas ramificadas, com segmentos organizados aos pares, mais ou menos pêndulas; as femininas, também aos pares pêndulos na frutificação, com bráctea pilosa. Eixo da infrutescência carnosos, apresentando numerosos frutos longos embutidos, com cerca de 2 mm de comprimento (Figura 2) (SIMÕES e MINGUZZI, 2011).



Figura 2. Folhas e frutos da *Cecropia pachystachya*. Fonte:

<http://cookislands.bishopmuseum.org/species.asp?id=5898>

C. pachystachya é considerada uma espécie pioneira, colonizadora de clareiras e de rápido crescimento, muito importante na regeneração de áreas degradadas pelo fato de atrair animais dispersores e melhorar as propriedades do solo, o que propicia condições mais favoráveis ao estabelecimento de outras espécies (BATISTA et al., 2008). Além disso, é uma importante espécie florestal para a indústria, já que utiliza sua madeira para confeccionar brinquedos, caixas leves, lápis e outros produtos, além da árvore possuir qualidade ornamental, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo e em reflorestamento. Nas relações ecológicas, suas folhas são muito apreciadas por animais como o bicho preguiça e seus frutos são procurados e consumidos por muitas espécies de pássaros (CARNEIRO, 1995).

As folhas e frutos de *C. pachystachya* são usados para o tratamento da asma e tosse. O suco obtido da raiz é utilizado como diurético e cardiotônico (SORARU e BANDONI, 1978; CONSOLINI et al., 2006; REYES, 2004). Devido ao seu extenso uso popular, já foi incluída na Farmacopeia Argentina (1978), onde é preparada como infusão a 5% ou decocção 4%. Entretanto, nem todos os seus efeitos farmacológicos foram comprovados cientificamente através de ensaios pré-clínicos, sendo demonstrada recentemente sua atividade hipoglicemiante em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano, por um período de tratamento de 42 dias (ARAGÃO et al., 2010).

1.4 Inflamação

Registros das características clínicas do processo inflamatório já constavam nos antigos papiros egípcios (\approx 3000 a.C.). Os sinais clássicos da inflamação foram descritos por Aulus Celsus (30 a.C. – 38 d.C.) como: rubor, calor, tumor e dor (VANE e BOTTING 1998). Um quinto sinal, a perda da função, foi acrescentado por Galeno (138 – 201 d.c.) . No século XVIII, Jonh Hunter verificou a dilatação dos vasos sanguíneos e Julius Cohnhein associou inflamação à emigração de leucócitos através das paredes da microvasculatura. No final do século XIX, Eli Metchnikoff enfatizou o papel da fagocitose no processo inflamatório, enquanto que em 1927, Thomas Lewis descreveu a importância dos mediadores químicos (MURPHY e WARD, 2006; WEISSMAN, 1992).

No decorrer dos séculos, vários estudos contribuíram para a fundamentação das bases do processo inflamatório, enriquecendo os conhecimentos sobre as células participantes e os mediadores químicos envolvidos, como o envolvimento de mastócitos descritos em 1877 por Paul Ehrlich, da histamina na “reação tríplice cutânea” em 1927 por Lewis, dos macrófagos na constituição dos granulomas por Virchow e no desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios (DA SILVA et al., 2003; ROBBINS et al., 2001).

A inflamação é um processo que envolve uma série de eventos que podem ser nomeados por numerosos estímulos, tais como, agentes infecciosos ou substâncias provindas do seu metabolismo (toxinas), interações antígeno-anticorpo, agentes físicos (radiação, queimadura, traumas) químicos, e injúrias mecânicas. (ROTELLI et al., 2003). Cada estímulo provoca um padrão característico de resposta que, apesar da diversidade e complexidade dos mediadores químicos, apresentam variação relativamente pequena (CARVALHO, 2004).

Após uma agressão ou estímulo é desencadeada uma cascata de eventos que resulta no aumento do calibre microvascular, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos, como consequência de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes no tecido cutâneo (queratinócitos, fibroblastos, mastócitos, células endoteliais, macrófagos) e vários mediadores pró-inflamatórios (RAUH, 2008).

As substâncias endógenas que provocam a modificação bioquímica e fisiológica da estrutura do local afetado pelo processo inflamatório são chamadas de

mediadores. Os principais mediadores envolvidos na inflamação são histamina, serotonina, bradicinina, metabólitos do ácido araquidônico (AA), citocinas, neuropeptídeos, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS), dentre outros (RANG et al., 2007). Inicialmente, estes mediadores são liberados no local onde se deflagrou o processo. Os macrófagos locais sinalizam a presença de material estranho ou lesão através destes mediadores e/ou citocinas que irão recrutar células circulantes (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) que apresentam um papel de amplificação no processo (FERREIRA, 1993).

1.4.1 Inflamação aguda

A inflamação aguda é uma resposta rápida a um agente nocivo encarregada de levar mediadores da defesa do hospedeiro – leucócitos e proteínas plasmáticas – ao local da lesão. A inflamação aguda possui três características principais: alteração no calibre vascular, que leva a um aumento no fluxo sanguíneo; alterações estruturais na microcirculação, que permitem que proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; e emigração dos leucócitos da microcirculação, seu acúmulo no foco de lesão e sua ativação para eliminar o agente nocivo (KUMAR et al., 2005) (Figura 3).

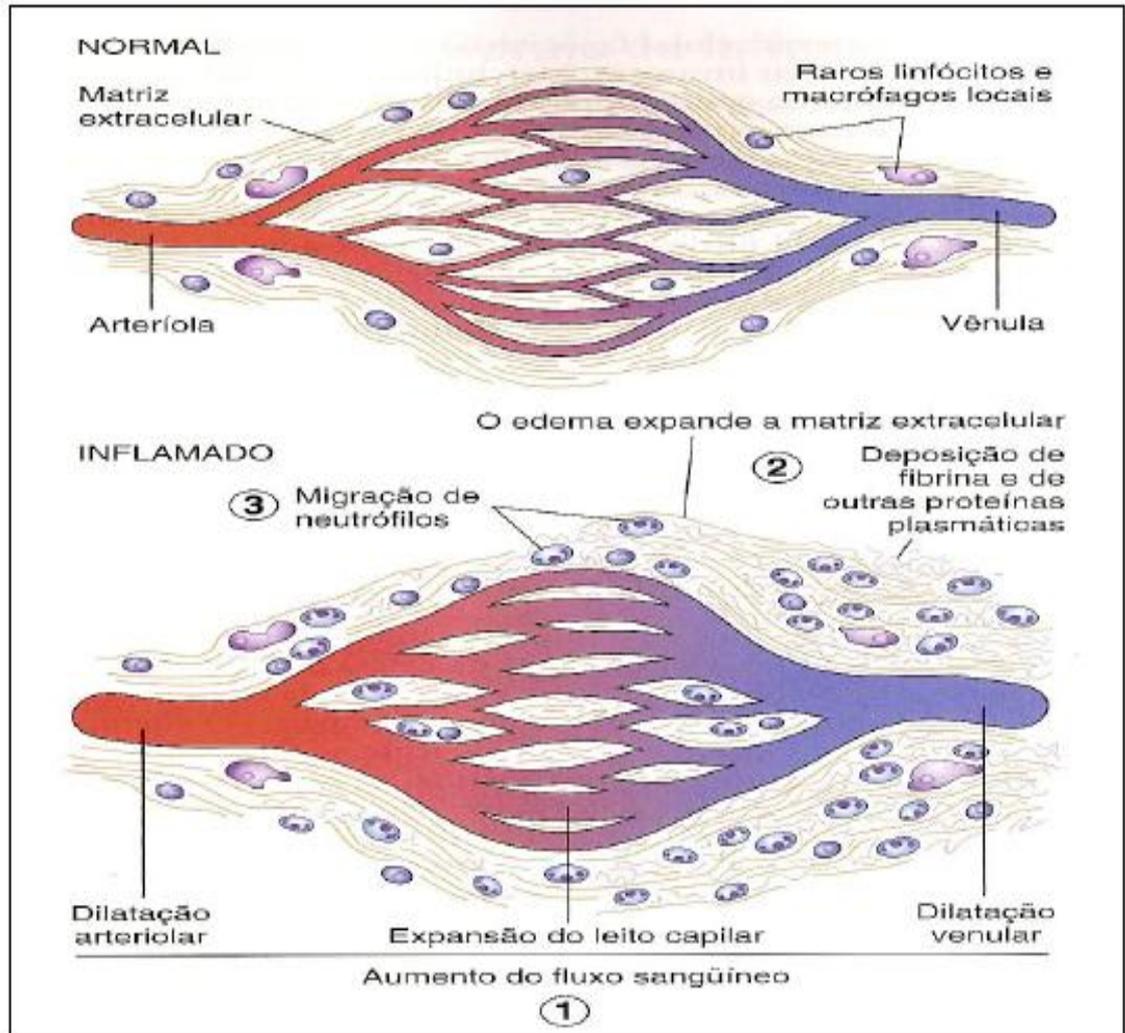


Figura 3. As primeiras manifestações locais da inflamação aguda comparadas com o tecido normal. (1) Vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo (eritema e calor). (2) Extravasamento e deposição de plasma e proteína (edema). (3) Migração e acúmulo de leucócitos no local da lesão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os eventos vasculares iniciam-se logo após a lesão e se desenvolvem em velocidades variáveis dependendo da intensidade da agressão. Primeiramente, ocorrem alterações no calibre vascular conduzindo ao aumento do fluxo sanguíneo, causador do calor e do rubor na área inflamada, logo seguido pelo alentecimento da circulação e instalação do processo de estase sanguínea permitindo a marginalização leucocitária (SZEKANECZ et al., 2004).

Outro sinal característico da inflamação é o edema, que é causado pelo fluxo transvascular de um fluido rico em proteínas (plasma) do compartimento intravascular para o interstício como resultado da ação de vários mediadores como histamina, bradicinina, leucotrienos, componentes do sistema complemento, substância P e fator de ativação de plaquetas (PAF) (DENZLINGER et al., 1985;

FRIEDL et al., 1989). Esses fatores alteram as funções de barreira de pequenos vasos sanguíneos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas tanto para água quanto para proteínas (DEMLING et al., 1982; DEMLING et al., 1984). Ao mesmo tempo, a pressão hidrostática dos capilares é aumentada no local do ferimento como resultado da vasodilatação local. Esta vasodilatação local ocorre principalmente devido a geração de metabólitos do ácido araquidônico particularmente prostaglandinas E2 e I2 (por macrófagos e células endoteliais ativadas) e por óxido nítrico (gerado pelas células endoteliais em resposta à histamina, bradicinina e substância P). O extravasamento do plasma leva a uma concentração de eritrócitos nos pequenos vasos sanguíneos aumentando assim a viscosidade do sangue. Concomitantemente à perda de proteínas plasmáticas, também ocorre diminuição da pressão oncótica intravenosa, e esses fatores juntamente com o aumento da permeabilidade vascular e o aumento transitório da pressão hidrostática nos capilares levam à indução do fluxo transvascular de líquido e proteínas para o interstício. A função destas alterações é permitir a chegada de anticorpos e proteínas ao local da lesão e facilitar a disponibilidade de células e mediadores inflamatórios a fim de diluir a inflamação. Ainda ocorre no local uma estase sanguínea que impede a disseminação de agentes infecciosos que possam estar presentes no local (SHERWOOD et al., 2004).

Dentre as células envolvidas na inflamação aguda algumas (como células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos teciduais) estão normalmente presentes nos tecidos, enquanto outras (como plaquetas e leucócitos) têm acesso ao mesmo através da corrente sanguínea (RANG et al., 2007). Os leucócitos mais abundantes no ser humano são os neutrófilos e eles expressam uma gama de moléculas de adesão (LUSTER et al., 2005). Estas células, em particular polimorfonucleares, tendem a se acumular no local da infecção constituindo o mecanismo inato, a primeira linha de defesa ao agente nocivo (DA SILVA et al., 2003; RUÈGG, 2006). A migração é composta por etapas: (1) emigração em direção ao estímulo quimiotático; (2) marginalização, rolamento e adesão; (3) saída do vaso sanguíneo por diapedese e (4) fagocitose e desgranulação a partir da ativação leucocitária (DA SILVA et al., 2003; ROBBINS et al., 2001).

Inicialmente ocorre uma frágil interação, levando ao processo de rolamento do leucócito sobre a superfície do endotélio. Em seguida, sobre ação do fator de necrose tumoral, TNF- α e da interleucina, IL-1 β , as células endoteliais expressam E-

selectina, VCAM-1 e ICAM-1 permitindo uma maior estabilidade na interação leucócito-endotélio propiciando a adesão leucocitária, projeção de pseudópodes por entre as células endoteliais e diapedese. Ao atravessarem a membrana basal os leucócitos migram até o local da infecção ao longo de um gradiente de fatores quimiotáticos (Figura 4). Os neutrófilos são as primeiras células a migrar, seguido de monócitos e linfócitos. Além de orientar a migração dos leucócitos os agentes quimiotáticos ativam estas células conduzindo a fagocitose, a desgranulação e secreção enzimática, a produção de mediadores químicos e a lesão do tecido devido à liberação moderada de produtos não apenas no interior do fagossomo, mas no espaço extracelular (DA SILVA et al., 2003; ROBBINS et al., 2001).

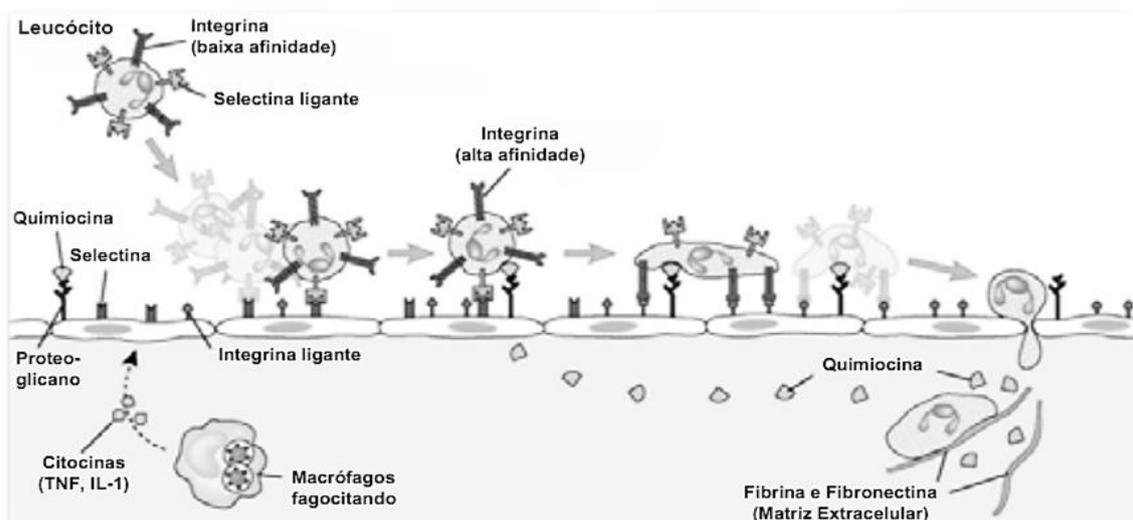


Figura 4. Representação do mecanismo de indução de adesão leucócito-endotélio na inflamação em resposta a um agente quimiotático (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Após o estabelecimento desses eventos iniciais, os tecidos são então invadidos por células inflamatórias. Primeiramente mediadores derivados de macrófagos como, fator de necrose tumoral (TNF) e quimiocinas, irão atrair mais neutrófilos para o local, assim como ativá-los. Esses mediadores, irão combinar-se ainda com outros como, prostaglandina E2 (PGE2) derivada de mastócitos e defensinas derivadas dos neutrófilos para recrutar linfócitos enquanto que os leucotrienos atraem células dendríticas que atuam como apresentadoras de antígeno. Os linfócitos promoverão a ativação de macrófagos, levando-os a secretar proteases, eicosanoides, citocinas e espécies reativas de oxigênio, que irão ativar outras células formando assim um ciclo de recrutamento e ativação celular. As

cininas promovem a liberação de citocinas como interleucina (IL)-1 e TNF, e a geração de mediadores como prostaglandinas e leucotrienos, auxiliando no início e na manutenção da reação inflamatória (SILVA, 2009). Um aumento nos níveis de ROS na pele pode levar a danos celulares que promovem várias condições patológicas, como respostas inflamatórias (SONG et al., 2008). Acrescentando, Portugal et al. (2007) descreve que a super produção ou remoção ineficiente de radicais livres ou ROS, denominada estresse oxidativo, contribui para surgimento de condições lesivas à pele, expressadas por eritema, edema, envelhecimento, inflamação, manifestação autoimune, hipersensibilidade, queratinização anormal e câncer de pele (BERNARDI, 2009).

A exposição celular às citocinas primárias (IL-1 e TNF- α) leva à ativação de algumas vias de sinalização, como das proteínas quinases (PKC, PKA) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que promove a estimulação da atividade de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB) e a proteína ativadora-1 (AP-1). Estes fatores quando ativados promovem a indução da transcrição gênica de diversas citocinas (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, etc), quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas responsáveis pela produção de mediadores inflamatórios secundários, óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (DELHASE, 2003; PASCUAL e GLASS, 2006). Assim, a principal função da IL-1 e do TNF- α , é desencadear a resposta inflamatória inata e atuar como uma molécula co-estimulatória da resposta imunológica (UCHI et al., 2000). Além disso, o TNF- α apresenta um papel importante na remodelação do tecido após um dano, pois atua como fator angiogênico e como fator de crescimento dos fibroblastos (BURBACH et al., 2000). Entre as citocinas secundárias destaca-se a IL-8, por ser um potente agente quimiotático responsável pelo recrutamento de leucócitos, preferencialmente os neutrófilos. Essa quimiocina estimula o movimento dos leucócitos e regula a migração destes do sangue para a região extravascular (SCHRAMM e THORLACIUS, 2004). Assim, a IL-8 coopera com a IL-1 e TNF- α no processo de infiltração leucocitária, considerando que a IL-1 e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, o que é um prelúdio à migração leucocitária ao local lesado (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Os metabólitos do AA (prostanoides) também desempenham um papel importante no processo inflamatório. Estes mediadores possuem uma ampla ação mediada por receptores específicos presentes em células-alvo (KABASHIMA e

MIYACHI, 2004). A produção das prostaglandinas e dos leucotrienos inicia-se com a liberação do ácido araquidônico a partir dos fosfolípidios de membrana, uma reação catalisada pela enzima fosfolipase A2 (PLA2). A PLA2 é ativada em resposta a vários estímulos, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento (C5a) nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ROS - espécies reativas de oxigênio, UV-B, agentes químicos, etc) (RANG et al, 2007). O AA uma vez liberado serve de substrato para as duas isoformas da enzima cicloxigenase (COX-1 e COX-2), onde é convertido em prostaglandinas e tromboxanos (PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2, TXA2), e também para a 5-lipoxigenase (5-LOX), sendo por essa via metabólica convertido em leucotrienos (LTB4, LTC4, LTD4, LTE4) (Figura 5) (RAUH, 2008).

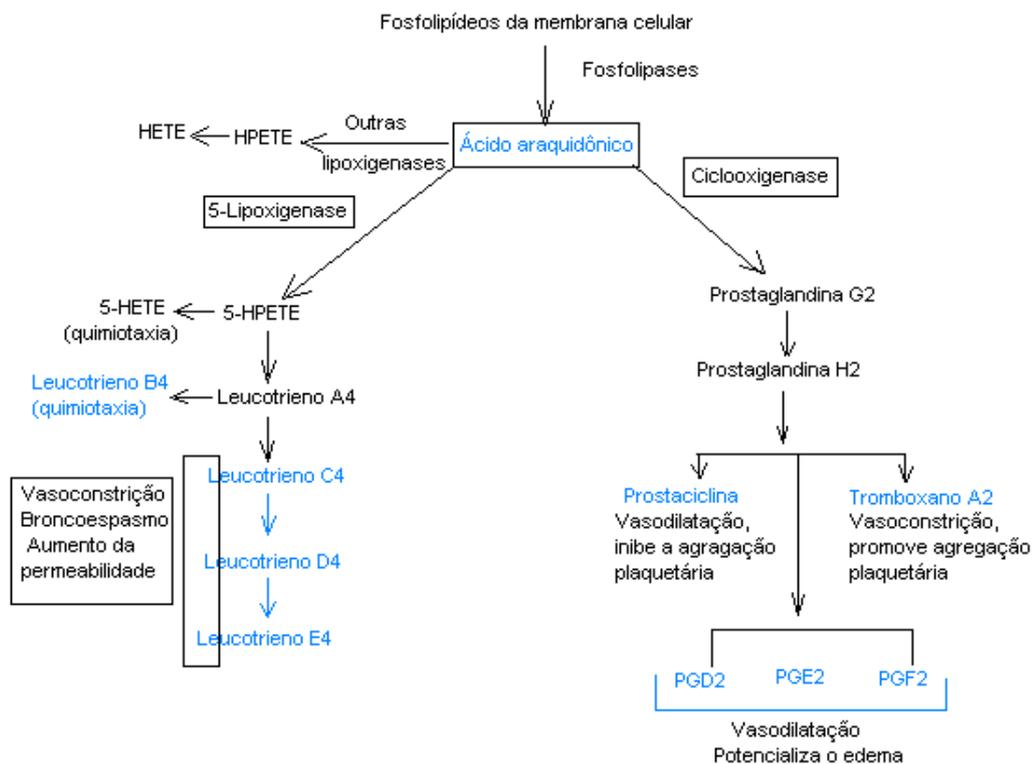


Figura 5. Geração de metabólitos do ácido araquidônico e sua participação na inflamação (COLLINS, 2000).

Na pele normal, a COX-1 está distribuída em toda a epiderme, enquanto a COX-2 se localiza principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório. A prostaglandina

E2 (PGE2) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, onde modula vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo assim na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. No entanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen do capilar para o espaço intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB4 (LEE et al., 2003; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). As PGE2 e PGD2, por sua vez, induzem a transcrição de enzimas requeridas para a síntese de uma outra classe de eicosanoides envolvidas na fase de resolução da fase inflamatória, como as lipoxinas (SERHAN e SAVILL, 2005).

Outros mediadores químicos como a histamina também desempenham uma ação importante durante o processo inflamatório atuando em muitos processos fisiológicos celulares, mas também intervindo nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse um dos principais motivos dos mastócitos estarem estrategicamente localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo como a pele, os pulmões e intestinos. A liberação da histamina ocorre pelo processo de exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas através da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, ela atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) levando à constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG et al, 2007; SCHARAMM e THORLACIUS, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outros mediadores químicos como a serotonina, substância P e neurocinina A também participam da regulação dos processos vasculares, contribuindo assim na resposta inflamatória. A função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (RAUH, 2008).

Como relatado anteriormente, muitos mediadores químicos envolvidos no processo inflamatório já foram descritos, bem como suas funções já foram descobertas. Mas, ainda não está elucidada exatamente a maneira coordenada que eles atuam (KUMAR et al., 2005).

Assim, a inflamação aguda pode culminar em resolução completa, com a cicatrização e reconstituição tecidual ou cura por fibrose, quando a destruição

tecidual é significativa, posterior ou não a formação de abscessos, ou ainda evoluir para a inflamação crônica (VENTURA, 2011).

Um evento que reflete a transição do processo inflamatório para o de resolução é a substituição de polimorfonucleares (PMN) ou eosinófilos por monócitos e macrófagos fagocíticos. A citocina IL-6 parece ser o principal determinante dessa troca de PMN por monócitos, além dos eicosanoides que também parecem auxiliar nessa transição (SILVA, 2009).

1.4.2 Inflamação crônica

A inflamação crônica origina-se posterior a uma inflamação aguda ou a resposta pode ser crônica quase desde o início (RUËGG, 2006). A transição de aguda para crônica pode ocorrer devido à persistência do agente lesivo, à interferência no processo de reparo tecidual, à desregulação de qualquer etapa acima citada ou como resultado de surtos agudos repetitivos (DA SILVA et al., 2003; ROBBINS et al., 2001).

O processo define-se por uma inflamação ativa, onde a destruição tecidual e a tentativa de reparo tecidual ocorrem simultaneamente. Em contraste com a inflamação aguda, que manifesta alterações vasculares, edema e infiltrado predominantemente neutrofílico, a inflamação crônica é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e monócitos; destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias; tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado através da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e, em particular, fibrose (KUMAR et al., 2005).

Os macrófagos são células centrais na inflamação crônica, em virtude da sua capacidade de secretar o maior número de produtos biologicamente ativos, como fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-1 β , óxido nítrico (NO), mediadores lipídicos, fatores de crescimento entre outros. São células mononucleares fagocíticas que se originam de um precursor comum na medula óssea (monoblasto) que dará origem aos monócitos sanguíneos (DA SILVA et al., 2003; ROBBINS et al., 2001). Os monócitos circulantes de acordo com seu fenótipo e estímulo apropriado podem

migrar para o sítio de inflamação e se diferenciar em macrófagos teciduais residentes ou células dendríticas (VENTURA, 2011).

Os macrófagos estão estrategicamente dispostos nos tecidos e, apesar de responderem quase tão rápido quanto os neutrófilos, possuem uma meia-vida maior persistem por mais tempo no sítio inflamatório e não são terminalmente diferenciados o que propicia a proliferação (CASTELLHEIM et al., 2009). A meia-vida dos monócitos é de aproximadamente um dia enquanto um macrófago tissular sobrevive por vários meses a anos (KUMAR et al., 2005).

Além da fagocitose, os macrófagos residentes são responsáveis por iniciar e regular a resposta imune inata e, conseqüentemente, a liberação de uma gama de mediadores atraindo e ativando leucócitos e linfócitos para a contenção da inflamação (VENTURA, 2011). Os macrófagos ativados secretam uma variedade de produtos biologicamente ativos que, se não forem controlados, resultam na lesão tecidual e fibrose características da inflamação crônica (KUMAR et al., 2005).

Os linfócitos T são mobilizados nas reações imunológicas mediadas por anticorpos e células, mas também, por razões desconhecidas na inflamação não imunológica (DA SILVA et al., 2003). Os linfócitos e macrófagos interagem de forma bidirecional, sendo importante na inflamação crônica. Os macrófagos apresentam os antígenos para as células T e produzem citocinas às respostas das células T. Os linfócitos T ativados produzem citocinas, dentre elas o INF- γ , que é o principal ativador de macrófagos (KUMAR et al., 2005).

Os plasmócitos se desenvolvem a partir de linfócitos B ativados e produzem anticorpos direcionados a antígenos persistentes no local da inflamação (CASTELLHEIM et al., 2009; LUSTER et al., 2005; ROBBINS et al., 2001). Assim, a gama de mediadores químicos produzidos por macrófagos, linfócitos e plasmócitos de maneira prolongada e de forma inapropriada conduz a grave lesão tecidual, principal característica da inflamação crônica (VENTURA, 2011).

Vale ressaltar que a inflamação crônica persistente aumenta o desenvolvimento de doenças degenerativas como artrite reumatóide, aterosclerose, Alzheimer, asma, esclerose múltipla, dentre outras (IWALEWA et al., 2007).

1.4.3 Farmacologia da inflamação

Os fármacos anti-inflamatórios são capazes de interferir no processo fisiopatológico da inflamação, objetivando minimizar os danos teciduais e proporcionar maior conforto ao paciente. Os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticoides e pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (VENTURA, 2011).

Os glicocorticoides são potentes mediadores anti-inflamatórios endógenos que são liberados em poucos minutos na resposta ao estresse e a lesão tecidual como mecanismo de controle da severidade da resposta inflamatória (GILROY, et al., 2004). Eles inibem a transcrição de várias citocinas importantes para a resposta inflamatória, como interleucinas, TNF α e fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos. Além disso, inibem a ação destas citocinas sobre fatores transcripcionais, como proteína ativadora-1 e o fator nuclear κ B (NF- κ B). Esse conjunto de atividades é considerado como responsável pela atividade dos glicocorticoides (BOLLER, 2007).

A ação anti-inflamatória dos glicocorticoides deve-se, principalmente, à inibição da transcrição do gene da enzima COX-2 e à indução da proteína lipocortina (ou anexina 1), inibidora da enzima fosfolipase A2, responsável pela conversão dos fosfolípídeos de membrana em ácido araquidônico. Como exemplo de glicocorticoide pode-se destacar a hidrocortisona e dexametasona (RANG et al., 2007).

Os AINES incluem uma diversidade de agentes e em geral, todos os seus efeitos estão relacionados com a inibição da ação da COX na produção de prostaglandinas e tromboxanas (CARVALHO, 2004; RANG et al., 2007). Os AINES tradicionais atuam de forma não-seletiva inibindo ambas as isoformas de COX e destacam-se neste grupo: o ácido acetilsalicílico, a indometacina, o piroxicam e o ibuprofeno (VENTURA, 2011).

Há dois tipos de COX, denominadas COX-1 e COX-2. A COX-1 é a enzima expressa constitutivamente na maioria dos tecidos, responsável por várias funções fisiológicas, como proteção da mucosa gástrica, agregação plaquetária, manutenção do fluxo sanguíneo renal e da homeostase vascular. A COX-2 não está normalmente expressa e pode ser induzida por estímulos incluindo a exposição a fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor carcinogênicos e endotoxinas. Ou seja, a COX-2 é encontrada em células inflamatórias ativadas, sendo esta a enzima que produz os metabólitos do AA durante uma inflamação. Portanto, os efeitos anti-

inflamatórios estão relacionados com a inibição da COX-2 e os efeitos colaterais mais conhecidos se devem principalmente à inibição da COX-1 (BOLLER, 2007).

Todos AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrointestinais que podem variar de dispepsia a sangramentos de estômago e duodeno, ativar doenças inflamatórias intestinais quiescentes e causar dano tecidual (como úlceras) no trato gastrointestinal baixo, geralmente, após um longo período de uso (MONTEIRO et al., 2008).

Deste modo, a comunidade científica e as indústrias farmacêuticas focaram seus esforços na busca de inibidores seletivos para COX-2, com menores efeitos colaterais adversos. Em 1999, G.D. Searle e Pfizer lançou o primeiro inibidor de COX-2 seletivo: o celecoxibe (Celebrex®). Apesar do sucesso inicial logo após o lançamento dos inibidores seletivos de COX-2, efeitos adversos cardiovasculares e renais têm sido relatados e, em altas doses, efeitos gastrointestinais (SOLOMON et al., 2004).

Devido a grande parte dos AINEs disponíveis no mercado possuírem efeitos indesejáveis significativos, a necessidade de novos medicamentos anti-inflamatórios contribui para o avanço da pesquisa por novas moléculas, mais seguras, eficazes e com menos efeitos colaterais (VENTURA, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato metanólico da *Cecropia pachystachya* (EMCP) em modelos de inflamação cutânea aguda e crônica em camundongos, bem como investigar seus possíveis mecanismos de ação.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito anti-inflamatório do EMCP na fase aguda da inflamação utilizando modelos de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, cujo principal constituinte é o 12-Otetradecanoilforbol acetato (TPA), pelo ácido araquidônico (AA), capsaicina, fenol e etil-fenil-propiolato (EPP) em camundongos;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do EMCP em processo inflamatório cutâneo crônico, utilizando o modelo de edema de orelha mediado pela aplicação múltipla do óleo de cróton em camundongos;
- Avaliar os parâmetros de inflamação - vasodilatação e congestão vascular, edema, infiltrado inflamatório polimorfonuclear (inflamação aguda) e mononuclear (inflamação crônica) - por meio da análise histológica das orelhas obtidas nos modelos de edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton e pela aplicação múltipla deste mesmo agente flogístico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Folhas de *Cecropia pachystachya* foram coletadas em novembro de 2008, em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. A exsicata (CESJ 46591) foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2 Preparo do extrato

As folhas de *Cecropia pachystachya* foram secas em estufa com circulação forçada de ar à 40 °C, a fim de obter o material seco (60 g). As folhas secas (60 g) foram moídas e macerado com metanol (3 x 200 mL) durante cinco dias à temperatura ambiente até a exustão. O extrato foi então concentrado utilizando um evaporador rotativo sob pressão reduzida (rendimento 26 g) e mantido no frasco hermeticamente fechado sob refrigeração.

3.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, pesando entre 25 e 35 g, provenientes do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade 45 – 55%, fotoperíodo de 12h e livre acesso à água e à ração comercial (NUVITAL™, Colombo, PR, BR). Protocolo nº 021/2012.

3.4 Protocolos Experimentais (Modelo de Edema de Orelha)

O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica, por ser bastante simples e permitir verificar a atividade de

compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GÁBOR, 2000).

3.4.1 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica única de óleo de cróton

O teste foi realizado de acordo com o método descrito por SCHIANTARELLI e colaboradores (1982) com pequenas modificações. Os animais foram divididos em 5 grupos. Foi aplicado topicamente 20 µL de uma solução fresca de óleo de cróton 5 % (v/v) em acetona, no pavilhão auricular direito. Quinze minutos após a aplicação do agente flogístico, os animais receberam tratamento tópico com 20 µL de EMCP nas seguintes concentrações: 1 mg/orelha - grupo 1; 0,5 mg/orelha - grupo 2 e 0,1 mg/orelha - grupo 3. O mesmo volume de dexametasona 0,1 mg/orelha e de acetona (veículo) foi utilizado como controle positivo - grupo 4 e controle negativo - grupo 5, respectivamente. Seis horas após as aplicações, foi realizada a medição do edema. O edema foi expresso como o aumento da espessura (µm) da orelha dos camundongos. A espessura foi medida próxima à extremidade medial da orelha e registrada com o auxílio de um micrômetro digital. O edema foi avaliado pela diferença entre a medida basal e a medida após determinado tempo da indução do processo inflamatório. Para minimizar variações referentes à técnica, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador. Amostras dos tecidos das orelhas dos camundongos (discos de 6 mm de diâmetro de tecido) foram coletadas 24 horas após a aplicação do óleo de cróton e submetidas à técnica histológica.

3.4.2 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico

Para avaliação da ação do EMCP sobre o edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico, este foi diluído em acetona, de forma a atingir uma concentração de 2 mg/orelha, sendo posteriormente administrado por via tópica na orelha direita dos camundongos. Os animais foram divididos em 5 grupos. Em seguida, o EMCP (1 mg/orelha – grupo 1, 0,5 mg/orelha – grupo 2 e 0,1 mg/orelha – grupo 3), o controle positivo indometacina (0,5 mg/orelha) – grupo 4, também dissolvidos em 20 µL de acetona, e a acetona (controle negativo) – grupo 5 foram aplicados

topicamente. O edema foi avaliado 1 hora após o desafio com o agente flogístico (PUIGNERO et al. 1998; YOUNG et al., 1984)

Os animais foram eutanasiados e, com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram obtidos de ambas as orelhas de cada animal. Os discos foram pesados em balança analítica e a diferença de peso entre eles (orelha direita – orelha esquerda) indicou a intensidade do edema. A média de porcentagem de inibição edema (%) foi calculada em relação ao grupo controle negativo.

3.4.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

Para verificar a atividade do EMCP nesse modelo o edema foi induzido pela aplicação tópica de fenol 10% em acetona (20 μ L/orelha) na orelha direita de camundongos. Os animais foram divididos novamente em 5 grupos. O EMCP (1 mg/orelha – grupo 1, 0,5 mg/orelha – grupo 2 e 0,1 mg/orelha – grupo 3) assim como a dexametasona (0,1 mg/orelha), usada como controle positivo – grupo 4, e a acetona, usada como controle negativo – grupo 5, foram aplicados imediatamente após o fenol nos grupos experimentais. Neste modelo, o aumento da espessura da orelha foi avaliado 2 horas após a aplicação do fenol, conforme descrito no item 3.4.2 (GÁBOR, 2000).

3.4.4 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

Com o objetivo de avaliar o efeito do EMCP em um modelo de inflamação cutânea neurogênica, os animais foram divididos em 2 grupos, a capsaicina foi dissolvida em acetona na concentração de 200 μ g/orelha e aplicada topicamente na orelha direita dos camundongos 15 minutos antes da aplicação tópica do extrato (1 mg/orelha – grupo 1) e da acetona – grupo 2, usada como controle negativo. Na orelha esquerda foi aplicada acetona, também 15 minutos antes da aplicação da capsaicina. O edema foi avaliado 30 minutos após a aplicação do agente flogístico, conforme o procedimento descrito no item 3.4.2 (GABOR e RAZGA, 1992).

3.4.5 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica de EPP (propiolato de feniletila)

O EPP será dissolvido em acetona na concentração de 50 mg/mL. O edema será induzido pela aplicação tópica de 20 μ L da solução de EPP preparada anteriormente. Os animais foram divididos em 5 grupos. A orelha esquerda recebeu o veículo (acetona). O extrato (1 mg/orelha – grupo 1, 0,5 mg/orelha – grupo 2 e 0,1 mg/orelha – grupo 3), a dexametasona – grupo 4, dissolvidos em acetona, e a acetona usada como controle negativo – grupo 5, foram aplicados 16 horas antes da aplicação do EPP e imediatamente após. A inflamação foi medida 1 hora após a indução da inflamação, e o procedimento foi idêntico ao descrito no item 3.4.2 (GINER et al, 2000; RECIO et al., 2000).

3.4.6 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do EMCP em um processo inflamatório já estabelecido, foi utilizado um modelo de inflamação crônica, caracterizado pela aplicação múltipla do óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação do óleo de cróton 5% (v/v) em acetona (20 μ L/orelha) em dias alternados durante 9 dias. Os animais foram divididos em 3 grupos. O EMCP (0,5 mg/orelha – grupo 1), a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) – grupo 2 e a acetona (controle negativo) – grupo 3, foram aplicados por via tópica durante 4 dias, duas vezes ao dia, (a primeira vez logo após a aplicação do óleo de cróton e a segunda 6 horas depois dessa aplicação), esse procedimento teve início a partir do quinto dia de experimento, sendo o edema avaliado diariamente. No 9º dia do experimento foi feita a aplicação do óleo de cróton, porém, só foi feito um tratamento nesse dia, que ocorreu logo após a aplicação do agente flogístico e seis horas depois da aplicação do óleo de cróton os animais foram sacrificados e discos de 6 mm de diâmetro do tecido das orelhas foram coletados para ser realizada a análise histológica. O procedimento foi realizado de acordo com a técnica proposta por Stanley et al, (1991), com pequenas modificações.

3.5 Análise histológica

As amostras de tecidos obtidas (orelhas coletadas dos camundongos submetidos ao modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, aplicação simples e múltipla) foram, imediatamente após a exérse, imersas em solução fixadora (formol a 10%) por um período mínimo de 24 horas. Após a fixação, as amostras foram clivadas e submetidas ao processamento histológico, ou seja, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (álcool 70°, 80°, 90°, absoluto 1, 2 e 3), diafanizadas em duas trocas de xilol, embebidas e incluídas em parafina. Os blocos confeccionados foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes de 5 µm de espessura, utilizando-se micrótomo rotativo manual (American Optical 820), e distendidos em lâminas de microscopia, as quais foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). Os cortes foram analisados sob microscopia de luz para a verificação semi quantitativa de possíveis alterações histológicas como a presença de vasodilatação/congestão vascular, edema e infiltrado inflamatório.

Foram capturadas imagens de áreas representativas selecionadas das lâminas de microscopia através do programa eletrônico Image Pro-Plus 4.5 Media Cybernetics™ acoplado a um microcópico óptico Olympus BX51.

3.6 Análise Estatística

Os ensaios para verificação da atividade anti-inflamatória *in vivo* tiveram os resultados expressos pela média ± erro padrão médio (e.p.m). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman-Keuls ou pelo teste “t” de student. Para análise dos resultados apresentados no modelo de inflamação crônica foi realizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Diferenças entre as médias dos tratamentos no nível de 5% ($p < 0,05$) comparadas ao controle negativo, foram consideradas significativas. Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica única de óleo de cróton

O TPA, um éster de forbol, é um dos constituintes ativos presentes no óleo de cróton capaz de induzir resposta inflamatória bastante intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, ativação da proteína quinase C, liberação dos metabólitos do ácido araquidônico, indução de enzimas, entre outros eventos, sendo utilizado, portanto, como agente irritante em modelo de triagem da verificação da atividade anti-inflamatória tópica (GÁBOR, 2000). Nesse modelo, o EMCP apresentou atividade em todas as concentrações, sendo mais significativo nas concentrações de 0,5 mg/orelha e 0,1mg/orelha, apresentando uma redução significativa do edema, sendo a porcentagem de inibição de 64,% e 58%, respectivamente. Na concentração de 1 mg/orelha, o percentual de inibição de ECMP foi de 45%. O controle positivo (dexametasona 0,1 mg/orelha) provocou uma redução do edema em 92% (Figura 6).

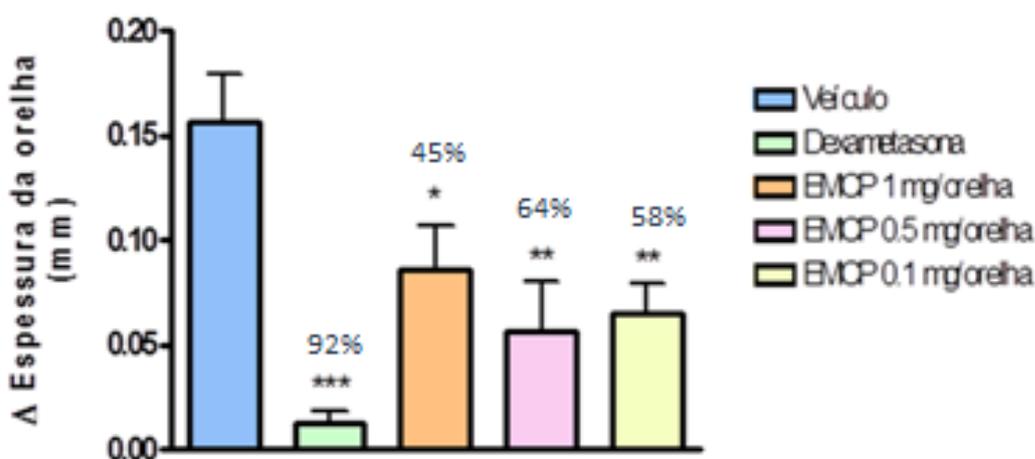


Figura 6: Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (espessura da orelha) induzido pela aplicação simples de óleo de cróton em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m (n=7-8). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05. ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

4.2 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico

O ácido araquidônico quando aplicado topicamente é metabolizado em vários mediadores que promovem a formação do edema, como a PGE₂, LTC₄ e LTD₄, como consequência do processo inflamatório instalado. Esses mediadores estão envolvidos com o desenvolvimento do edema bem como com o extravasamento plasmático, mudanças no fluxo sanguíneo e eritema (HUMES et al., 1986). Assim, compostos que inibem o metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas e leucotrienos são identificados neste modelo. O EMCP nas concentrações de 1mg/orelha e 0,5 mg/orelha apresentaram uma redução significativa do edema, sendo estatisticamente igual à indometacina (usada como controle positivo). A porcentagem de inibição foi de 72 % para a maior concentração e de 65 % para a concentração intermediária. A indometacina apresentou uma redução do edema de 83%. O EMCP na concentração de 0,1 mg/orelha promoveu inibição da formação do edema no valor de 28 % (Figura 7). Nesse modelo, EMCP apresentou atividade dose-dependente.

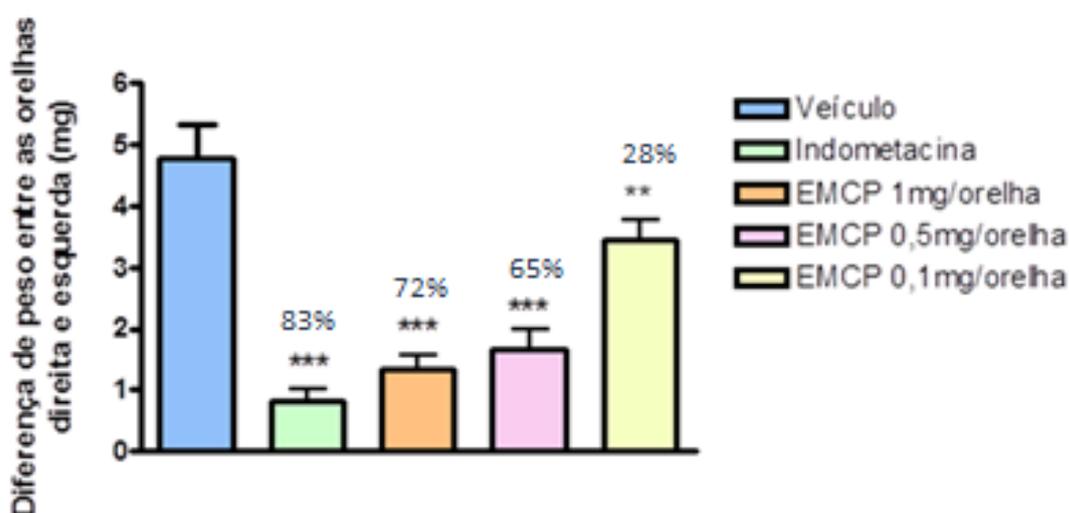


Figura 7: Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do ácido araquidônico em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. (n=6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). ***p < 0,001; p** < 0,01. ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

4.3 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de fenol

A dermatite induzida pelo fenol consiste em um modelo animal de inflamação cutânea causada pelo referido agente irritante que se assemelha à dermatite de contato que ocorre em humanos (LIM et al., 2004). Há uma formação intensa de edema na orelha dos animais do grupo controle uma hora após a aplicação tópica do fenol. O EMCP nas concentrações de 1 mg/orelha e 0,5 mg/orelha apresentou uma redução significativa do edema, sendo que a porcentagem de inibição foi de 65% e 53%, respectivamente. De maneira ainda mais eficiente, a aplicação tópica do EMCP na concentração de 0,1 mg/orelha promoveu inibição da formação do edema induzido pela aplicação do fenol, em 91%, sendo estatisticamente igual ao tratamento com a dexametasona que reduziu o edema em 98% (Figura 8).

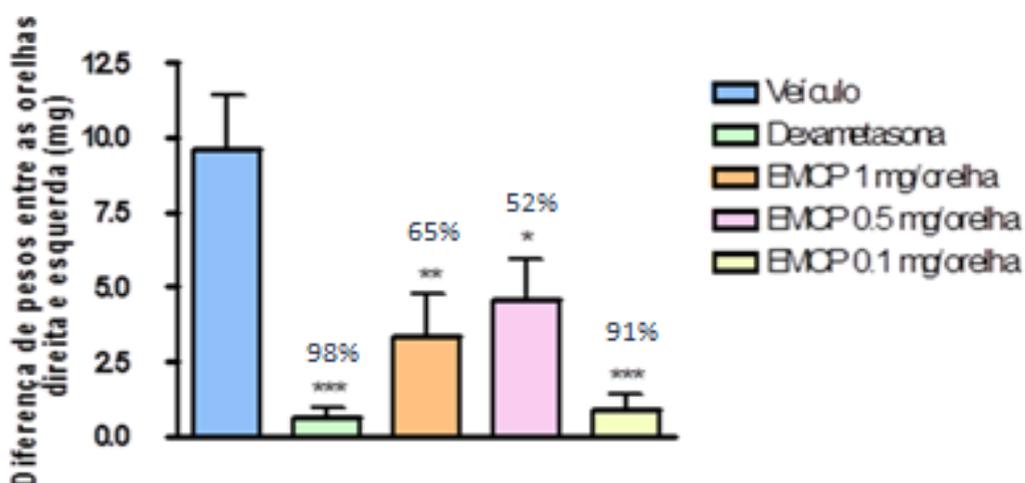


Figura 8: Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do fenol em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. (n=5-6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05. ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

4.4 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de capsaicina

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), um alcaloide encontrado na pimenta vermelha, quando aplicada tópica ou localmente produz rapidamente uma sensação dolorosa associada à sensação de queimação. Esse efeito provém da ativação de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e da liberação de mediadores neurogênicos da inflamação (ZEGARSKA et al., 2006). A resposta inflamatória à capsaicina (aplicação tópica - 200 μ g/orelha) desenvolveu-se tendo sua intensidade máxima 30 minutos após a sua aplicação. A Figura 9 mostra que o EMCP (1

mg/orelha), aplicado 15 minutos antes do desafio com a capsaicina não foi capaz de reduzir estatisticamente o edema provocado por esse agente indutor.

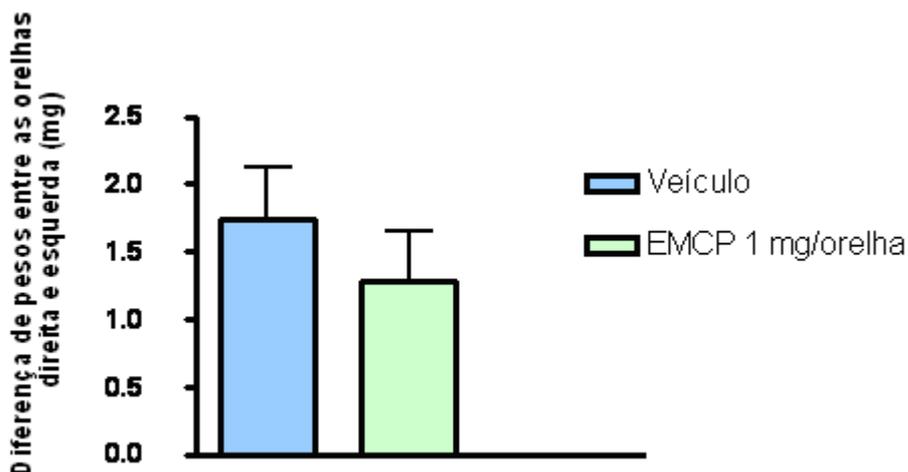


Figura 9: Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação da capsaicina em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. (n=7-8). Análise estatística pelo teste "t".

4.5 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de EPP

O edema causado pela aplicação tópica de EPP é devido à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular. Este acontecimento é causado pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina e prostaglandinas (BRATTSAND et al., 1982). O EMCP nas concentrações de 0,5 e 0,1 mg/orelha apresentaram significativa redução do edema quando comparado com o controle negativo, sendo a redução de 56% e 76%, respectivamente. Dessa forma, é também importante salientar que na menor concentração do extrato (0,1 mg/orelha) essa redução foi ainda mais acentuada que o fármaco utilizado como controle negativo que promoveu uma redução de 52%.

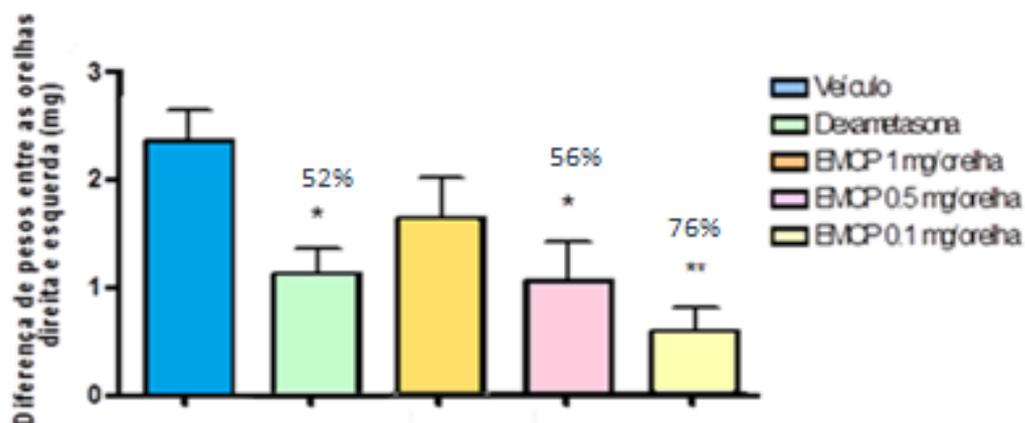


Fig. 10. Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (peso das orelhas) induzido pela aplicação do EPP em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. (n=6-7). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). ** p < 0,01; *p < 0,05. ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

4.6 Efeito do EMCP no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do EMCP em um processo inflamatório já estabelecido, foi utilizado um modelo de inflamação crônica, caracterizado pela aplicação múltipla do óleo de cróton. Conforme demonstrado na Figura 11, a aplicação tópica do EMCP (0,5 mg/orelha) na orelha dos camundongos não promoveu uma diminuição significativa da espessura da orelha durante todos os dias do experimento. Por outro lado, a dexametasona (0,1 mg/orelha) foi capaz de reduzir significativamente o edema após 1 (p < 0,05), 2 (p < 0,001), 3 (p < 0,001), 4 (p < 0,001) e 5 (p < 0,001) dias do início do tratamento, sendo confirmado pela avaliação do percentual de edema no último dia do experimento (Figura 12) e efeito inibitório médio de 34% (p < 0,05).

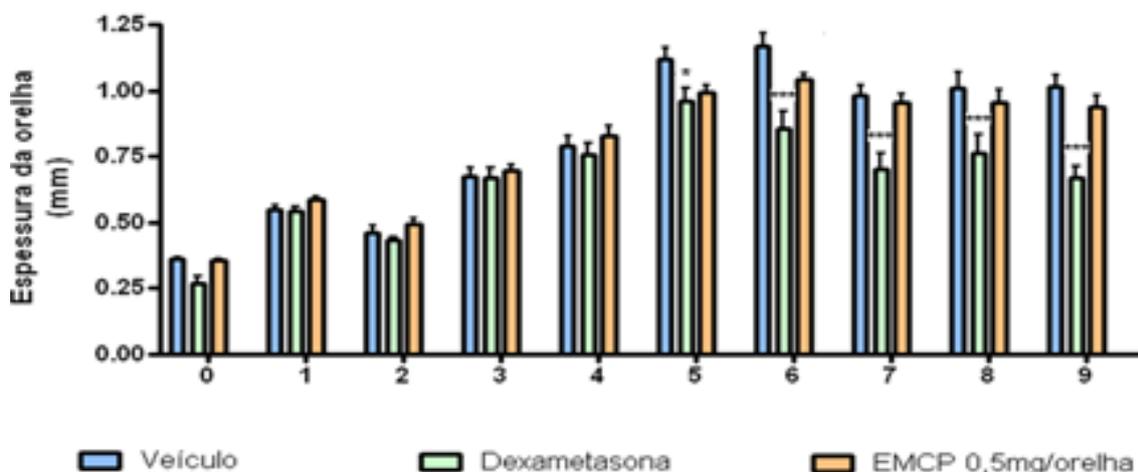


Figura 11: Efeito do EMCP via tópica sobre o edema (espessura da orelha) induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos. As barras verticais representam a média \pm e.p.m. (n=9-11). Os símbolos representam o nível de significância quando comparado ao grupo controle negativo (veículo). ***p < 0,001; *p < 0,05. ANOVA duas vias, seguido do teste de Bonferroni.

4.7 Análise histológica

Para confirmação do efeito anti-inflamatório do EMCP, foi realizada a análise histológica semi quantitativa considerando-se parâmetros do processo inflamatório, como congestão vascular/vasodilatação, edema e infiltração leucocitária, relativos ao tratamento com o EMCP em orelhas de camundongos 24 horas após a aplicação única do óleo de cróton (figura 12) e orelhas de camundongos após múltiplas aplicações do mesmo (figura 13)

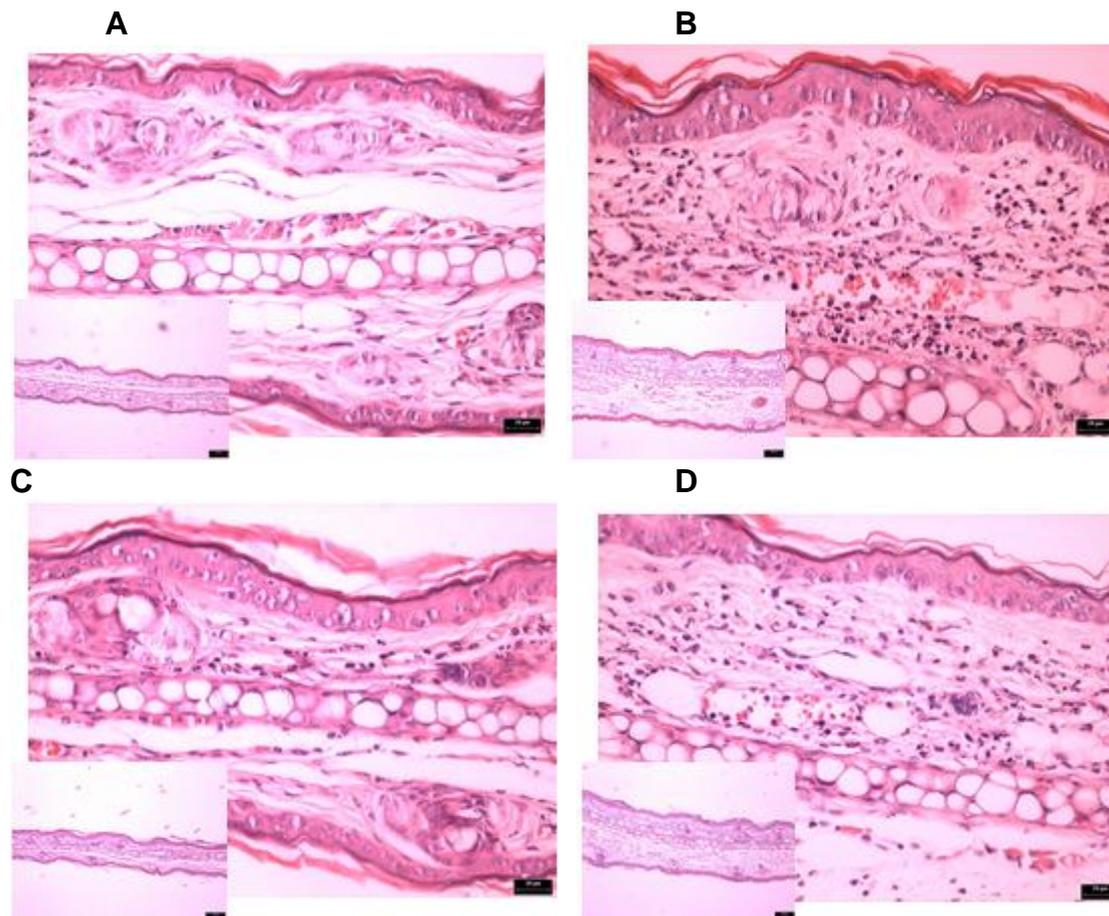
No modelo da aplicação única do óleo de cróton, observou-se um aumento na espessura da orelha pelo intenso edema, congestão vascular/vasodilatação e infiltrado inflamatório dérmico (figura 12 B). No grupo em que não houve aplicação do óleo de cróton observa-se ausência de alterações histológicas (figura 12 A). Nos animais submetidos à aplicação tópica do EMCP nas três concentrações realizadas (1 mg/orelha (figura 12 D), 0,5 mg/orelha (figura 12 E) e 0,1 mg/orelha (figura 12 F), assim como no grupo controle submetido ao tratamento com dexametasona, as alterações histológicas citadas anteriormente foram menos satisfatórias (figura 12 C).

No modelo de aplicação múltipla do óleo de cróton, observou-se, além de considerável edema, congestão/vasodilatação e infiltração leucocitária na derme, a presença de alteração epidérmica caracterizada pela hiperplasia epitelial associada à hipergranulose e hiperkeratose com camada córnea compacta (figura 13 B). No

grupo em que não houve aplicação do óleo de cróton, o aspecto estava dentro dos limites da normalidade (figura 13 A). Nas amostras dos animais submetidos à aplicação tópica da dexametasona (0,1 mg/orelha) houve atenuação dos parâmetros inflamatórios avaliados assim como da hiperplasia epidérmica (figura 13 C). Os animais tratados com a aplicação do EMCP 0,5 mg/orelha a resposta inflamatória foi pouco atenuada contudo, a hiperplasia epidérmica foi menos intensa (figura 13 E).

Em todos os grupos avaliados no modelo de aplicação múltipla do óleo de cróton, incluindo o grupo do controle negativo, algumas amostras apresentaram áreas focais de ulceração recobertas por material fibrino-necrótico com subjacente processo inflamatório agudo, caracterizando o início de um processo de reparo tecidual.

Óleo de cróton de única aplicação



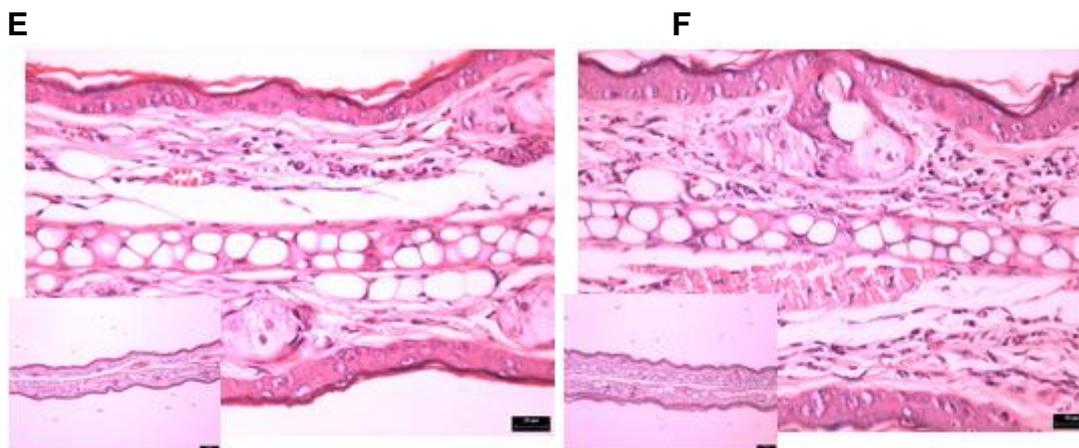


Figura 12: Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 μ m e 400x, escala de 20 μ m), 24 horas após aplicação única de óleo de cróton. (A) veículo sem aplicação do óleo de cróton, (B) óleo de cróton + veículo, (C) dexametasona - 0,1 mg/orelha, (D) tratamento com EMCP (1 mg/orelha), (E) tratamento com EMCP (0,5 mg/orelha), (F) tratamento com EMCP (0,1 mg/orelha).

O resumo dos resultados alcançados na análise histológica semi quantitativa do efeito anti-inflamatório do EMCP nas concentrações avaliadas (1; 0,5; e 0,1 mg/orelha) estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Análise histológica semi quantitativa dos parâmetros da inflamação aguda induzida pela aplicação única de óleo de cróton

	Edema	Vasodilatação/congestão vascular	Infiltrado inflamatório
Controle negativo (acetona)	+++	+++	+++
Controle positivo (dexametasona)	+	+	+
EMCP 1mg/orelha	+ / ++	+ / ++	+ / ++
EMCP 0,5 mg/orelha	+	+	+ / ++
EMCP 0,1 mg/orelha	+	+ / ++	+ / ++

0 - Ausente; + leve; ++ moderado; +++ intenso

Óleo de cróton múltiplo

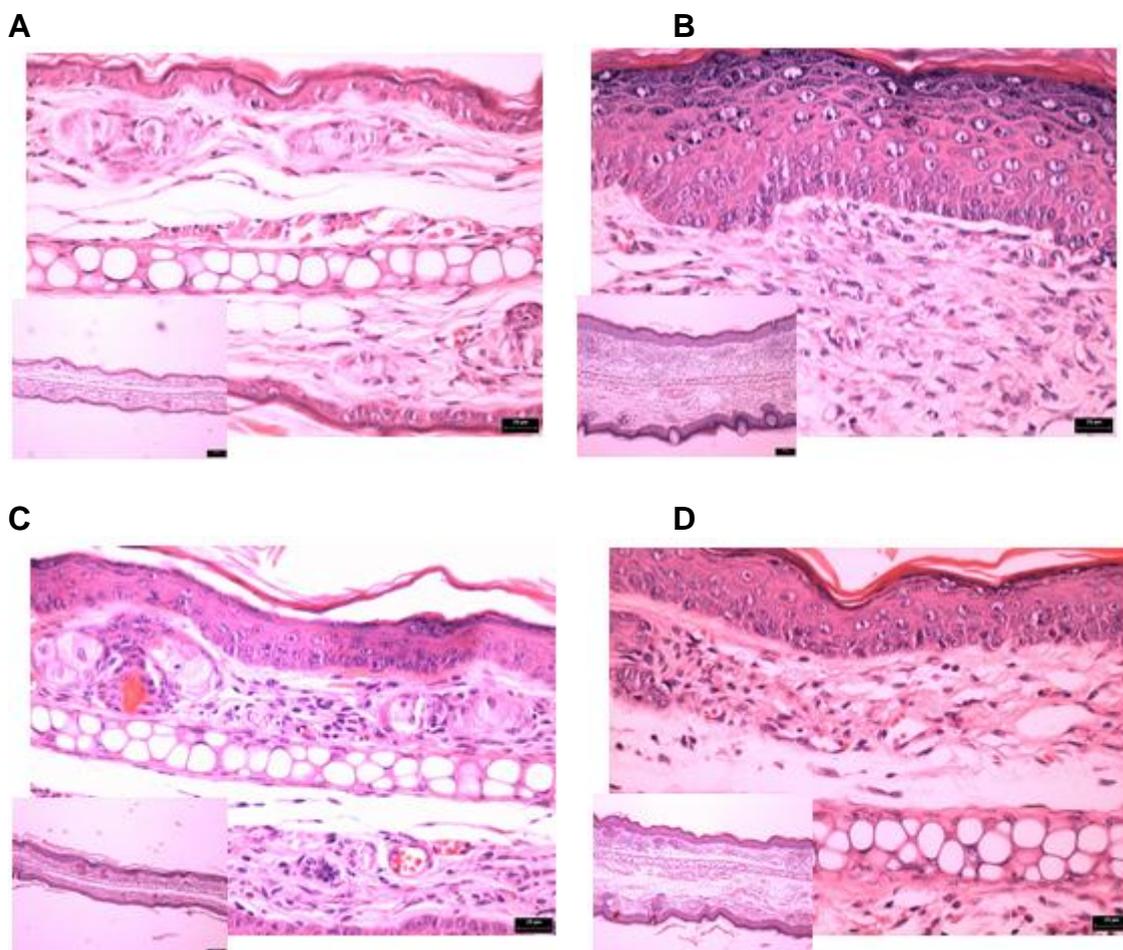


Figura 13: Fotos representativas dos cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (HE) (100x, escala 50 μ m e 400x, escala de 20 μ m), após aplicação múltipla de óleo de cróton. (A) veículo sem aplicação do óleo de cróton, (B) óleo de cróton + veículo, (C) dexametasona - 0,1 mg/orelha, (D) tratamento com EMCP (0,5 mg/orelha)

O resumo dos resultados alcançados na análise histológica semi quantitativa do efeito anti-inflamatório do EMCP na concentração testada de 0,5 mg/orelha estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Análise histológica semi quantitativa dos parâmetros da inflamação crônica induzida pela aplicação múltipla de óleo de cróton

	Edema	Vasodilatação/ congestão vascular	Infiltrado inflamatório	Hiperplasia epidérmica
Controle negativo (acetona)	+++	+++	+++	+++
Controle positivo (dexametasona)	+	+	+	+
EMCP 0,5mg/orelha	++	++	++	++

0- Ausente; + leve; ++ moderado; +++ intenso

Em alguns animais de todos os grupos foram observadas áreas de ulceração de natureza não determinada (pode ter sido causada pelo próprio animal ao se coçar, ou por um outro animal na mesma gaiola, ou até mesmo devido à aplicação repetida do óleo de cróton). A úlcera, perda do epitélio de revestimento (epiderme) desencadeia um processo de reparo tissular iniciado através da instalação de um processo inflamatório agudo (CASTAÑON, 1997).

5 DISCUSSÃO

O gênero *Cecropia* possui diversas espécies que são constantemente utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios como reumatismo e inflamações do fígado e dos pulmões, explorando assim suas propriedades anti-inflamatórias (CONSOLINI et al., 2006). Atividade anti-inflamatória oral já foi reportada para o extrato metanólico de *C. pachystachya* (ARAGÃO et al., 2012), porém após extensa revisão bibliográfica, não foram encontrados na literatura relatos sobre o potencial anti-inflamatório tópico da *C. pachystachya*. Assim, a investigação dessa possível atividade anti-inflamatória tópica se faz necessária para comprovação da eficácia desta espécie nas doenças inflamatórias cutâneas, considerando que o uso tradicional não é suficiente para validar o uso uma planta medicinal como eficaz e segura.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito redutor de processos inflamatórios tópicos pela ação do EMCP em diferentes modelos animais de inflamação cutânea. Entre os modelos de inflamação cutânea, destaca-se o edema de orelha, que utiliza uma metodologia simples e, além disso, pode ser induzido por inúmeros agentes irritantes. Entre as vantagens desse modelo pode-se destacar o fato de necessitar de pouca quantidade de amostras para estudos “*in vivo*”, além de permitir a obtenção rápida de resultados. Sendo assim, esse modelo constitui um método importante para a investigação de novos medicamentos para doenças inflamatórias que acometem a pele (BOUCLIER et al., 1990; VANE, 1998).

O processo inflamatório caracteriza-se por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Assim, a utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos experimentais, como o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, permite avaliar o potencial anti-inflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (DE YOUNG et al., 1989; GÁBOR, 2000). Os agentes flogísticos utilizados no presente trabalho apresentam ação tópica e induzem uma inflamação local. Isto é resultado da produção de mediadores pró-inflamatórios que promovem a vasodilatação, infiltração de células PMN e extravasamento de plasma, conduzindo assim à instalação dos sinais clássicos da inflamação (DE BERNARDIS et al., 1994; FURSTENBERGER et al., 1983). Assim,

os modelos de inflamação cutânea permitem identificar compostos com atividade anti-inflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (BOUCLIER et al., 1990; CARLSON et al., 1985; VANE, 1998).

O modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton consiste num modelo útil para a triagem da atividade anti-inflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÁBOR, 2000; MARKS, 1990).

O TPA é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, que por sua vez é uma mistura de lipídios extraídos da espécie *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae) conhecida por sua atividade flogística. A aplicação tópica desse agente está associada com resposta inflamatória, estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes nucleares. O TPA por via tópica leva a uma resposta inflamatória aguda que causa vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido e formação de edema (GABOR, 2000; GARG et al., 2008). De acordo com estudos que procuram elucidar o mecanismo de ação do TPA na pele de camundongos, a aplicação deste agente promove alteração de diversos processos incluindo crescimento, diferenciação e morte celular, além da resposta inflamatória. Todos os efeitos parecem ser provenientes da ativação direta da PKC (proteína quinase C). Embora uma variedade de cascatas de sinalização intracelulares seja ativada em resposta ao TPA, parece que o primeiro local de ação desse éster de forbol é a membrana celular onde ativa a PKC por mimetizar seu ativador natural, o diacilglicerol, ligando-se em sítios específicos de seu domínio regulatório (GARG et al., 2008).

Assim, o TPA promove o aumento da atividade da PKC bem como da ativação sequencial da via da MAP quinase, fosfolipase A2, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular epidérmica, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (DE BERNARDIS et al, 1994; MURAKAWA et al., 2006).

A ativação da PKC gera um aumento na atividade da enzima fosfolipase A2 (PLA2), aumentando a liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídios de

membrana, levando a um aumento de seus metabólitos como leucotrienos e prostaglandinas (GARG et al., 2008). Esses metabólitos são conhecidos por agirem como mediadores das vias inflamatórias desencadeadas pela atividade das enzimas COX e lipoxigenase (LOX). Produtos do metabolismo do AA como prostaciclina e leucotrieno B₄ (LTB₄) agem de forma a aumentar a permeabilidade vascular, o que sustenta a formação de edema durante o processo inflamatório (BRALLEY et al., 2007; GABOR, 2000). Portanto, nesse modelo o edema está intimamente associado com o aumento no conteúdo de eicosanoides como PG e LTB₄. Assim, não só os inibidores de COX e LOX, mas também os antagonistas de LTB₄ são capazes de inibir o edema induzido por TPA. Isso sugere que os eicosanoides possuem importante função na inflamação de pele induzida por TPA (MURAKAWA et al., 2006). Nakamura et al. (2003) sugerem que os metabólitos do AA produzidos via LOX são moléculas fundamentais para a formação do edema e infiltração leucocitária nesse modelo, considerando que a PGE₂ contribui no aumento do fluxo sanguíneo através de sua ação vasodilatadora, enquanto os produtos via LOX (leucotrienos, LT) são necessários para o extravasamento plasmático consequente formação do edema e infiltração leucocitária (YOUNG et al., 1984).

Além do mecanismo exposto, o TPA induz também, a expressão de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , que participam ativamente no processo inflamatório cutâneo (LEE et al., 2009; MURAKAWA et al., 2006). A IL-1 β ativa uma via que irá resultar na transcrição de uma série de genes que levarão a expressão de diversas moléculas importantes para o processo inflamatório como moléculas de adesão, quimiocinas, citocinas secundárias, a enzima óxido nítrico sintase e cicloxigenase (OTUKI et al., 2005). O TNF- α também é responsável pela indução da expressão de diversos genes que irão sustentar a resposta inflamatória cutânea. Além disso, o TNF- α ativa a via de sinalização de transdução que irá ativar o NF- κ B, o que leva um “feedback” pró-inflamatório positivo (AMIGÓ et al., 2007).

Outra ação do TPA está ligada ao aumento da expressão da enzima COX-2, que é responsável por catalisar a biossíntese das PGs. A expressão de COX-2 induzida pela aplicação de TPA é regulada por diferentes fatores de transcrição incluindo NF- κ B e AP-1. Estudos demonstraram que a aplicação tópica de TPA facilita a translocação nuclear e a ligação ao DNA do NF- κ B, através da fosforilação do I κ B. Essa fosforilação, por sua vez, é mediada por proteínas quinases reguladoras de sinal extracelular (KUNDU et al., 2009). A transcrição de citocinas

como IL-1 β e TNF- α e muitos outros efetores como moléculas de adesão e enzimas, é regulada pelo fator de transcrição NF-kB (DE VRY et al., 2005). A atividade transcricional do NF-kB é regulada por uma série de eventos de transdução e sinalização intracelular, bastante elaborados (PARK et al., 2008). Assim, compostos capazes de inibir a atividade das enzimas PLA2, COX e LOX, antagonizar os efeitos dos eicosanoides, bloquear a ativação de fatores de transcrição como NF-kB ou modular a atividade de quinases, podem ser identificados nesse modelo, uma vez que são capazes de diminuir ou inibir o processo inflamatório induzido por TPA (KUNDU et al., 2009).

A aplicação tópica do EMCP, assim como o medicamento utilizado como referência (dexametasona) reduziu de forma significativa a formação do edema após a indução do processo inflamatório pelo TPA. Ao inibir o edema nesse modelo, EMCP está provavelmente interagindo especificamente com alguma dessas vias acima descritas e pode, portanto, ser um interessante alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos anti-inflamatórios (GARBOR, 2000).

Atividade antioxidante já foi descrita para EMCP (ARAGÃO et al., 2010), sendo que essa atividade pode ser decorrente da capacidade de compostos presentes na planta de atuarem como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (SADIK et al., 2003). A pele está cronicamente exposta a ROS oriundas tanto do ambiente como de fontes endógenas, além da superprodução de certas ROS e citocinas que podem desencadear graves problemas neste tecido (PORTUGAL et al., 2007). Nas doenças inflamatórias, os níveis de ROS estão consideravelmente aumentados, contribuindo para o dano tecidual e a exacerbação do processo inflamatório, portanto a atividade antioxidante de EMCP também pode estar auxiliando na diminuição do processo inflamatório, por exemplo, através da sua ação sequestradora de EROS (PÉREZ-GARCIA, 1996). Em relação à atividade anti-inflamatória, substâncias antioxidantes podem atuar modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como PLA2, COX e LOX, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MIDDLETON et al. 2000, CAZAROLLI, et al., 2008; LÓPEZ-POSADAS, 2008).

O modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton também permite avaliar outros parâmetros inflamatórios importantes envolvidos em muitas doenças cutâneas, como por exemplo, infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (GÁBOR, 2000; WINYARD, 2003). Por isso, foi realizada a análise histológica da orelha inflamada retirada ao final do experimento.

Após análise histológica das orelhas submetidas ao modelo de óleo de cróton de única aplicação foi possível verificar que no grupo controle negativo (figura 12 B), em que não foi realizado o tratamento tópico, houve instalação de intenso edema, congestão vascular e vasodilatação além da presença de infiltrado inflamatório leucocitário predominantemente neutrofílico. Contrastando com esse grupo, observou-se no grupo controle positivo (animais tratados com dexametasona 0,1mg/orelha – figura 12 C) considerável diminuição tanto do edema e vasodilatação/congestão vascular quanto do infiltrado inflamatório neutrofílico. Nos animais tratados com EMCP na concentração de 1mg/orelha (figura 12 D) observou-se redução moderada do edema e redução leve do infiltrado inflamatório. Enquanto que, na concentração de 0,5 (figura 12 E) e 0,1 (figura 12 F) mg/orelha houve uma leve diminuição do infiltrado inflamatório e uma diminuição considerável do edema e da congestão vascular. Esses resultados morfológicos correspondem aos resultados observados na inibição do edema, nos quais EMCP inibiu o edema em 64 % e 58 % nas concentrações de 0,5 e 0,1 mg/orelha, respectivamente.

Para auxiliar na investigação sobre o mecanismo pelo qual EMCP promove seu efeito anti-inflamatório, foram utilizados outros agentes flogísticos que desencadeiam processos inflamatórios agudos por mecanismos distintos, como o ácido araquidônico (AA), fenol, capsaicina, e EPP.

A aplicação tópica do AA gera uma resposta inflamatória rápida caracterizada por intenso eritema e edema com pequeno acúmulo de neutrófilos, quando comparado com a migração celular verificada no modelo de TPA, cujos principais mediadores envolvidos são PGE₂, LTC₄ e LTD₄, (CRUMMEY et al., 1987; HUMES et al., 1986; YOUNG et al., 1983).

AA é convertido em PGG₂ e, posteriormente, em PGH₂ pela enzima COX (LAWRENCE et al., 2002). A COX catalisa o primeiro passo na síntese de prostanoídes, uma grande família de metabólitos do AA, incluindo PG e TX (KULKARNI e DHIR, 2009) e as LOX produzem os LT também a partir do AA (KUMAR et al., 2005). As PG são mediadores autacóides que afetam praticamente

todos os processos fisiológicos e patológicos através de sua interação reversível com receptores de membrana acoplados à proteína G (FITZPATRICK, 2004). Os LT, assim como as PG, têm ação vasodilatadora e edematogênica (ALLER et al., 2006; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Os LT, em especial o LTB₄, também ativam as respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de enzimas lisossomais, além da potente atividade quimiotática (KUMAR et al., 2005). AA pode ainda atuar como um segundo mensageiro que regula muitos processos celulares, entre os quais a formação de NO (SIGNORELLO et al., 2009).

Anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) produzem os seus efeitos terapêuticos através da inibição da COX. Duas isoformas de COX foram identificadas e são referidas como COX-1 e COX-2. A COX-1 é expressa constitutivamente e regula uma série de funções, tais como homeostasia vascular e gastroproteção, enquanto que COX-2 é induzível por mediadores, tais como fatores de crescimento, citocinas e endotoxinas, estando presente em locais de inflamação (KULKARNI e DHIR, 2009). Assim, o fármaco de referência utilizado neste modelo experimental foi a indometacina, um AINE cuja ação anti-inflamatória está relacionada com a inibição não-seletiva das isoformas da COX (COX-1 e COX-2) e que reverte efetivamente o edema induzido pela aplicação tópica do AA, conforme descrito na literatura (GABOR, 2000). Da mesma forma que a indometacina, EMCP foi capaz de reduzir o edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico. Este resultado indica que o extrato pode interferir em parte na degradação do AA tanto pela COX como pela LOX.

Segundo Carlson e colaboradores (1985), os modelos de edema de orelha induzidos por TPA e AA são extremamente úteis na detecção *in vivo* de inibidores da COX/LOX ou 5-LOX. No entanto, os metabólitos do AA também promovem a degranulação de mastócitos, de forma que a liberação de histamina contribui parcialmente na formação do edema neste modelo (CAMP, 1982). Assim, deve-se considerar que o modelo do AA não é específico para a identificação de compostos que inibem exclusivamente a COX e/ou LOX, pois outros agentes como antagonistas da histamina e antioxidantes também reduzem o edema induzido pelo AA (CRUMMEY, 1987).

É importante ressaltar que a resposta inflamatória produzida pela aplicação de TPA possui mecanismos que parecem diferir dos mecanismos envolvidos na

resposta desencadeada pela aplicação de AA. Uma dessas diferenças fica evidenciada ao verificar que inibidores da PLA2 não interferem na resposta inflamatória do AA, enquanto que apresentam pronunciado efeito anti-inflamatório no modelo induzido por TPA (GABOR, 2000; OTUKI et al., 2005). Sendo assim, os resultados obtidos com o EMCP no modelo de AA indicam que um dos seus mecanismos como anti-inflamatório tópico deve envolver inibição na via do AA, pois foi capaz de inibir a formação de edema nos dois modelos. Esse mecanismo poderá posteriormente ser analisado melhor através de dosagem de mediadores e verificação da ação direta de EMCP sobre as enzimas envolvidas na cascata. Para uma melhor caracterização da propriedade anti-inflamatória foi avaliado ainda o efeito do EMCP sobre o modelo de edema de orelha induzido pelo fenol, que mimetiza a dermatite de contato irritativa (LIM et al., 2004). A exposição da pele ao fenol e compostos fenólicos afeta uma parcela da população no mundo inteiro, sendo que a maior via de exposição é o contato com a pele que ocorre principalmente na indústria durante a produção de resinas, tintas, cosméticos e produtos farmacêuticos. Esse contato com a pele resulta, na maioria das vezes, em queimaduras, ulcerações, inflamação, necrose e dermatite de contato irritativa e alérgica, e ainda acredita-se que a ação dos compostos fenólicos na pele auxilie na promoção de câncer (MURRAY et al., 2007).

Em resposta a estímulos exógenos, como o fenol, os queratinócitos produzem mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM et al., 2004; WILMER et al., 1994). Um dos mecanismos pelos quais o fenol promove a irritação cutânea seria a ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 α pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e ROS, e ainda a lesão ou estimulação direta de outros tipos celulares residentes na pele, como células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais (WILMER et al., 1994).

Muitos dos efeitos tóxicos desencadeados pela aplicação de fenol são devido à oxidação do fenol ou compostos fenólicos por enzimas como peroxidases, prostaglandinas sintases e tirosinases, que irão dar origem a radicais fenoxil. Esses radicais são então reduzidos por tióis para regenerar os compostos fenólicos formando assim um ciclo redox que cada vez mais produz radicais livres. Os radicais livres formados nesse ciclo diminuem a capacidade antioxidante da pele induzindo o

estabelecimento de estresse oxidativo, o que pode levar a danos em proteínas, DNA e lipídios (LIM et al., 2004; MURRAY et al., 2007). A geração de radicais livres pode ser um importante contribuinte para a toxicidade dérmica dos compostos fenólicos, uma vez que a presença de ROS causa um aumento na produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , LTs e PGs, os quais provavelmente são responsáveis pela resposta inflamatória que se segue a exposição ao fenol, já que esses mediadores amplificam a resposta inflamatória estimulando outras citocinas e mediadores (MURRAY et al., 2007).

As citocinas pró-inflamatórias são induzidas nesse modelo do fenol por um mecanismo distinto daquele observado no modelo de inflamação cutânea induzido pelo TPA, onde a indução das citocinas ocorre via ligação a receptores específicos, através de vias dependentes da PKC, nas quais envolvem fatores de transcrição nuclear (WILMER et al., 1994).

O EMCP foi capaz de reverter o edema induzido pela aplicação de fenol, o que sugere que esse extrato provavelmente possui atividade para dermatite de contato desencadeada por agentes irritantes. Além disso, este resultado indica que o EMCP atua provavelmente por mais de um mecanismo, visto que foi tão efetivo contra a resposta desencadeada pelo fenol, quanto contra a resposta desencadeada pelo TPA (SILVA, 2009). Assim, esses dados sugerem que o EMCP pode estar exercendo sua ação anti-inflamatória por atuar sobre esses mediadores, como eficientemente demonstrado nos modelos do AA e TPA, e pela sua ação antioxidante (RAUH, 2008).

A capsaicina (8 – metil – N – vanilil – 6 – noneamida) é um alcaloide encontrado na espécie da pimenta vermelha *Capsicum annuum* L., e quando aplicada topicamente produz uma resposta inflamatória neurogênica imediata, que se caracteriza por vasodilatação arteriolar, aumento de fluxo sanguíneo e consequente formação de edema decorrente do extravasamento plasmático, além de desencadear sensibilização a dor (GÀBOR; 2000; HOLZER, 1991; SHOLZEN et al, 2003; ZEGARSKA et al., 2006).

Há mais de cinquenta anos, a capsaicina vem sendo descrita por muitos pesquisadores, como um agente capaz de induzir a inflamação em modelos animais (GABÓR, 2000). Ela exerce seus efeitos sobre um alvo específico, os receptores vaniloides de potencial transitório tipo 1 (TRPV1). Portanto, sabe-se que a capsaicina age através da sua ligação com esses receptores vaniloides, provocando

a liberação de neuropeptídios (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), taquicinas), esses por sua vez induzem a liberação das monoaminas (histamina e serotonina) que agem como um mediador secundário no aumento da permeabilidade vascular em sítios inflamados. A ligação capsaicina/receptor provoca também a liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato); NO e mediadores inflamatórios para a periferia; além de promover a transmissão de informação de dor para o corno dorsal da medula espinhal (SAKURADA et al., 2003; SANTOS e CALIXTO, 1997)

Em nosso estudo, o EMCP não foi capaz de inibir o edema induzido pela capsaicina, ou seja, o extrato parece não ter ação sobre receptores específicos da capsaicina (receptores TRPV1) bem como não promove o impedimento significativo da ação de neuropeptídeos e monoaminas. Alguns estudos demonstraram que o edema induzido pela aplicação tópica da capsaicina é inibido por antagonistas da histamina e serotonina, mas não por inibidores da COX, como a indometacina. A dexametasona (anti-inflamatório esteroide), a clorfeniramina (bloqueador dos receptores H1) e a metisergida (antagonista de receptores 5-HT), promovem a redução do edema no modelo da capsaicina, porém nenhum deles tem sua ação específica sobre os receptores TRPV1 (GÁBOR, 2000).

No modelo em que o agente flogístico é o EPP, tem-se a formação do edema devido à vasodilatação e ao aumento da permeabilidade vascular. Este acontecimento é causado pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina, bradicina e prostaglandinas (BRATTSAND et al., 1982). O EMCP marcadamente inibiu a formação de edema de orelha induzida pelo EPP. Sugere-se, portanto, que o EMCP possui atividade anti-inflamatória também por atuar através da inibição destes mediadores inflamatórios da fase aguda da inflamação.

A ação do EMCP sobre processos inflamatórios cutâneos crônicos foi avaliada através do modelo de aplicação múltipla do óleo de cróton. Como previamente relatado, ésteres de forbol presentes no óleo de cróton, como o TPA, ativam a PKC, aumentam a permeabilidade vascular, induzem a síntese de metabólitos do AA e induzem a expressão da COX-2, IL-1 β , TNF- α e da molécula de adesão ICAM-1 (DE YOUNG et al., 1989; CHI et al, 2003; GUPTA et al., 2003). A aplicação múltipla do óleo de cróton promove uma reação inflamatória persistente acompanhada do aumento do peso das orelhas, intensa migração de neutrófilos,

macrófagos e linfócitos T e hiperproliferação epidérmica (acantose), aproximando este modelo das características presentes em algumas doenças inflamatórias crônicas da pele (STANLEY et al.,1991, LEE et al., 2009). Anti-inflamatórios esteroidais (corticoides) e inibidores da LOX são ativos nesse modelo, enquanto que os inibidores da COX, como a indometacina, se mostram inativos (GREEN e SHUSTER, 1987).

Na análise histopatológica dos grupos submetidos ao modelo de inflamação crônica e tratados com dexametasona e EMCP na concentração de 0,5 mg/orelha observou-se efeito anti-inflamatório com eficácia moderada assim como,considerável redução da hiperplasia epidérmica em áreas sem ulceração, contrastando com a hiperplasia epidérmica intensa no grupo de animais não tratados (controle negativo), também em áreas sem ulceração (Figura 13B) . Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que durante o processo inflamatório há a liberação de fatores (citocinas) liberados ou por células do tecido conjuntivo alterado ou pelo infiltrado inflamatório, que atuam como fatores mediadores que possivelmente influenciam no crescimento epidérmico (HÜBNER et al., 1996; KOMINE et al., 1996). Ou seja, a qualidade e quantidade do infiltrado inflamatório dérmico, e cofatores de crescimento liberados podem justificar a diminuição da espessura da epiderme observados nos grupos tratados com dexametasona e EMCP 0,5 mg (Figura 13 C e 13D). Os resultados alcançados nesses grupos e observados na análise histológica, são sugestivos da ação anti-inflamatória indireta do EMCP, mesmo com a espessura das orelhas inalteradas. As áreas de ulceração observadas em alguns animais, de todos os grupos, do modelo de inflamação crônica podem ter sido causadas pelo próprio animal ao se coçar, ou por um outro animal na mesma gaiola, ou até mesmo devido à aplicação repetida do óleo de cróton. A úlcera, perda do epitélio de revestimento (epiderme) desencadeia um processo de reparo tissular iniciado através da instalação de um processo inflamatório agudo (CASTAÑON, 1997). Esse fato pode explicar a inflamação aguda (associada a intenso edema, vasodilatação, congestão vascular e infiltrado leucocitário) observada focalmente nessas amostras e também pode justificar o motivo pelo qual não se observou diminuição na espessura das orelhas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o extrato metanólico de *Cecropia pachystachya* possui atividade anti-inflamatória tópica e indicam que um dos seus mecanismos de ação como anti-inflamatório tópico deve envolver inibição na via do AA, pois foi capaz de inibir a formação de edema nos modelos de TPA e AA. Outro fator importante é que EMCP atua provavelmente por mais de um mecanismo, visto que foi tão efetivo contra a resposta desencadeada pelo fenol, quanto contra a resposta desencadeada pelo TPA. Assim, esses dados sugerem que o EMCP pode estar exercendo sua ação anti-inflamatória por atuar sobre mediadores, como eficientemente demonstrado no modelo do EPP e também por apresentar ação antioxidante. Além disso, a ação demonstrada no processo crônico torna a *C. pachystachya* uma planta com potencial interessante para ser utilizada no desenvolvimento de formulações dermocosméticas destinadas ao tratamento de diversas condições dermatológicas. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o mecanismo de ação pelo qual essa planta exerce seus efeitos, bem como estudos que comprovem a segurança do seu uso tópico em humanos.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. e LICHTMAN, A.H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005.
- AGRIANUAL. **Pelo aproveitamento racional das plantas medicinais da Amazônia**. FNP Consultoria e Comércio, p. 28-29. 2002.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 10, p. 225 – 234, 2006.
- AMIGÓ, M.; PAYÁ, M.; DE ROSA, S.; TERCENIO, M.C. Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF-alpha generation and NF-kappaB activation in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 353-365, 2007.
- ARAGÃO, D.M.O.; GUARIZE, L.; LANINI, J.; COSTA, J.C.; GARCIA, R.M.G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629-633, 2010.
- ARAGÃO, D.M.O.; LIMA, I.V.A.; SILVA, J.M.; BELLOZI, P.M.Q.; COSTA, J.C.; CARDOSO, G.M.M.; FAGUNDES, E.M.S.; SCIO, E. Anti-Inflammatory, Antinociceptive and Cytotoxic Effects of the Methanol Extract of *Cecropia Pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, jun./jul., 2012.
- BATISTA, C.U.N.; MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C.; PIMENTA, J.A. Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* Trec. (Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. *Acta bot. bras.*, v. 22, n. 1, p. 91-98, 2008.
- BERNARDI, C.A. ***Garcinia gardneriana* (planchon & triana) zappi. como alternativa de anti-inflamatório tópico para o tratamento de doenças da pele: um estudo pr -clínico**. 2009. 86 f. Disserta o (Mestrado em farmacologia): Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.
- BOCCHESI, R.A.; OLIVEIRA, A.K.M.; LAURA, V.A. Germina o de sementes de *Cecropia pachystachya* Trécul (Cecropiaceae) em padrões anteriores e posteriores à passagem pelo trato digestório de aves dispersoras de sementes. **Revista de biologia e ciências da terra**, v.8, n.2, 2008.
- BOLLER, S. **Atividade antiinflamatória t pica do extrato e compostos isolados da *Baccharis illinita* dc, (asteraceae) em camundongos**. 2007. 110 f. Disserta o (Mestrado em farmacologia): Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2007.

- BORRIS, R.P. Natural Products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29-38, 1996.
- BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.
- BRADLEY, P. P. et al, Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, Utah, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.
- BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of Medicinal Food**, v. 10, p. 636-642, 2007.
- BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.
- BRATTSAND, R., THALEN, A., ROEMPKE, K., KALLSTROM, L., GRUVSTAD, E. Influence of 16 α , 17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids. **Journal of Steroid Biochemistry**, n. 16, p. 779–786, 1982.
- BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **the Biology of the Skin**. 1 ed. The New York: Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, n. 78, suplemento 1, p.98-106. 2008.
- CAMP, R.D. Prostaglandins, hydroxyl fatty acids, leukotrienes and inflammation of the skin. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 7, n. 4, p. 435-344, 1982.
- CARLINI, E.A. **Medicamentos, drogas e saúde**. São Paulo: Hucitec/Sobravime Editora, p. 23-28. 1995.
- CARLSON, R.P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J.; LEWIS, A. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic

agents. **Agents and Actions**, v.17, n. 2, p. 197-206, 1985.

CARNEIRO, J.G.A. Produção e controle de qualidade de mudas florestais. Universidade Federal do Paraná / Fupef-Unep, Curitiba. 1995. 451 p.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Ed. Tecmedd. 2004.

CASTAÑON, M. C. M. N. **Expressão das citoceratinas epidérmicas em dermatoses infecto-parasitárias**. 1997. 159f. Curso de Pós-Graduação em Medicina, Doutorado em Dermatologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O-L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M. AND MOLLNES T. E. Innate Immune Responses to Danger Signals in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, p. 479-491, 2009.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Mini-Rev. Med. Chem**. V. 8, p. 1429, 2008.

CHI, Y.S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.

CLARK, A. Natural Products. WILLIAMS, D. LEMKE, T.L. In: **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.

CONSOLINI, A.E.; RAGONE, M.A.; MIGLIORI, G.N.; CONFORTI, P.; VOLONTE, M.G. Cardiotonic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (Ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **J Ethnopharmacol**, n. 106, p. 90-96. 2006.

CRUMMEY, A.; HARPER, G.P.; BOYLE, E.A.; MANGAN, F.R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents and Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DA SILVA, W. D. AND MOTA, I. **Bier Imunologia Básica e Aplicada**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2003.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n. 1-2, p.29-33, 1994.

DE VRY, C.G.; VALDEZ, M.; LAZAROV, M.; MUHR, E.; BUELOW, R.; FONG, T.; IYER, S. Topical application of a novel immunomodulatory peptide, RDP58, reduces skin inflammation in the phorbol ester-induced dermatitis model. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, p. 473- 481, 2005.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DELHASE, M. I κ B kinase and NF- κ B signaling in response to pro-inflammatory cytokines. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.7, 2003.

DEMLING, R. H; HARMS, B; KRAMER, G.; GUNTHER, R. Acute versus sustained hypoproteinemia and posttraumatic pulmonary edema. **Surgery**, v. 92, p. 79–86, 1982.

DEMLING, R.H; KRAMER, G.; HARMS, B. Role of thermal injury-induced hypoproteinemia on fluid flux and protein permeability in burned and nonburned tissue. **Surgery**, v. 95, p.136-144, 1984.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN W.; KEPPLER D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Sci**, v. 230, p. 330–332, 1985.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1227, 1993.

FITZPATRICK, F.A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 6, p. 577-588. 2004.

FOX, L.P. Farmacologia dermatológica. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman - As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, p. 1534-1537, 2006.

FRANCO-ROSSELLI, P. Distributional patterns of Cecropia (Cecropiaceae): a panbiogeographic analysis. **Caldasia**, v.19, n. (1-2), p. 285-296, 1997.

FRIEDL, H. P.; TILL, G. O.; TRENTZ, O.; WARD, P. A. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. **Am J Pathol.**, v. 135, p. 203-217, 1989.

FURSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. **Science**. v. 220, p. 89-91, 1983.

GÁBOR, M. Mouse **Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GABOR, M. e RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear edema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249-1257, 2008.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, p. 401-416, 2004.

GINER, R-M. et al. Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. **European Journal of Pharmacology**, Valencia, 389, p. 243–252, 2000.

GOTTLIEB, A.B. Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. **Journal of American Academy Dermatology**. v. 53 , p. 16, 2005.

GREEN, C.A. e SHUSTER, S. Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. **British Journal of clinical pharmacology**. v. 24, p. 381-384, 1987.

GUPTA, M. *et al.* Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. **Phytomedicine**. v. 17, p. 804-806, 2003.

HERNÁNDEZ-TERRONES, M.G.; MORAIS, S.A.L.; LONDE, G.B.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Ação alelopática de extratos de embaúba (*Cecropia pachystachya*) no crescimento de capim-colonião (*panicum maximum*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4, p. 763-769, 2007.

HOLZER, P. Capsaicin: cellular targets, mechanism of action and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Review**, v. 43, p. 143-201, 1991.

<http://www.arvores.brasil.nom.br/new/embauba/index.htm>. Acesso em: 12/07/2012.

<http://cookislands.bishopmuseum.org/species.asp?id=5898>. Acesso em: 12/07/2012.

HÜBNER, G.; BRAUCHLE, M.; SMOLA, H.; MADLENER, M.; FÄSSLER, R.; WERNER, S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and glucocorticoid-treated mice. **Cytocine**, v. 8, n. 7, p. 548-556, 1996.

HUMES, J.L.; OPAS, E.E.; BONNEY, R.J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. LEWIS, A. e CAPETOLA, R. In: **Advances in Inflammations Research I**. New York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

KABASHIMA, K. e MIYACHI, Y. Prostanoids in the cutaneous immune response. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 1045-1051, 2004.

KOMINE, M.; FREEDBERG I.M.; BLUMENBERG, M. Regulation of epidermal expression of keratin 17 in inflammatory skin diseases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 107, n. 4, p. 569-575, 1996

KULKARNI, S.K.; DHIR, A. Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. **Drugs Today**, v. 45, n. 2, p. 135-154, 2009.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.

KUNDU, J.K.; HWANG, D.M.; LEE, J.C.; CHANG, E.J.; SHIN, Y.K.; FUJII, H.; SUN, B.; SURH, Y.J. Inhibitory effects of oligonol on phorbol ester-induced tumor promotion and COX-2 expression in mouse skin: NFkappaB and C/EBP as potential targets. **Cancer Letters**, v. 273, p. 86-97, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LEE do, Y.; CHOO, B.K.; YOON, T.; CHEON, M.S.; LEE, H.W.; LEE, A.Y.; KIM, H.K. Anti-inflammatory effects of Asparagus cochinchinensis extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 28-34, 2009.

LEE, J.L.; MUKHTAR, H.; BICKERS, D.R.; KOPELOVICH, L.; ATHAR, M. Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 192, p. 294-306, 2003.

LENTINI, F. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. **Fitoterapia**, v. 71 (suppl 1), p. 83-88, 2000.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWEL, M.D.; NOMURA, I.; HAMUD, Q. A. New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacol Research**. v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. **Biochem. Pharmacol.** v. 76, p. 495, 2008.

LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. v. 2, 2 edição, 2002. 368p.

LORENZI, H. e SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 3 ed. São Paulo: Ed. Nova Odessa: Plantarum, p. 476. 2001.

LUSTER, A. D.; ALON, R. AND VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1182-1190, 2005.

MARKS, F. e FÜRSTENBERGER, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n. 12, p. 2085-92, 1990.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. **Pharmacol. Rev.** v. 52, p. 673, 2000.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, 2008.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**. v. 71, p. 1331-1336, 2006.

MURPHY, H.S. e WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin, **Patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MURRAY, A.R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M.R.; SHVEDOVA, A.A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1769-1777, 2007.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 9, p. 997-1007, 2003.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, p. 253-259, 2005.

PARK, J.H.; LEE, C.K.; HWANG, Y.S.; PARK, K.K.; CHUNG, W.Y. Hemin inhibits cyclooxygenase-2 expression through nuclear factor-kappa B activation and ornithine decarboxylase expression in 12-Otetradecanoylphorbol- 13-acetate-treated mouse skin. **Mutation Research**, v. 642, p. 68-73, 2008.

PASCUAL, G. e GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PÉREZ-GARCIA, F.; MARIN, E.; CANIGUERAL, S.; ADZET, T. Anti-inflammatory action of *Pluchea sagittalis*: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**, v.59, n. 24, p. 2033-2040, 1996.

PORTUGAL, M.; BARAK, V.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 412-422, 2007.

POSER, G. L. e MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

PUIGNERO, V.; TURULL, A.; QUERALT, J. Arachidonic acid (aa) and tetradecanoylphorbol acetate (tpa) exert systemic effects when applied topically in the mouse. **Inflammation**, v. 22, n. 3, 1998.

RANG, H. P.; DALE, M.M; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2007.

RAUH, L.K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonia scorpioides* (Lam) Persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos.** 2008. 135f. Dissertação (Mestrado em farmacologia): Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.

RECIO, M. C. et al. *In vivo* Activity of Pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509 – 2518, 2000.

REYES, A. E. L. ***Cecropia pachystachya* Trec.** Disponível em: <<http://www.esalp.usp.br/trilhas/medicinal/am26.php?PHPSESSID=86614b7ecb55f04148a10610a3654c1b>> Acesso em: 13 jan 2012.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43-49, 2008.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Fundamentos de Robbins – Patologia Estrutural e Funcional.** 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2001.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; DE LA ROCHA, N.E.; PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological research**. v. 48, p. 601-606, 2003.

RUÈGG, C. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 80, p. 682-684, 2006.

SADIK, C. D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonóides: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v.65, p. 773-781, 2003.

SAKURADA, T.; MATSUMARA, T.; MORUYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO,S.; SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicina-induced desensitization in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** [S.l], v.75, p.115-121, 2003.

SANTOS, A.R. e CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci Lett.** [S.l] v.235, p.73-76, 1997.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflamatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxican. **Arzneim.- Forsch./Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

SCHOLZEN, T.E.; STANDER, S.; RIEMANN, H.; BRZOSKA, T.; LUGER, T.A. Modulation of cutaneous inflammation by angiotensin-converting enzyme. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3866-3873, 2003.

SCHRAMM, R e THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflammation research**, v. 53, n. 12, p. 644-652, 2004.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: Um guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde**. 4.ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2002.

SERHAN, N.C. e SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SIGNORELLO, M.G.; SEGANTIN, A.; LEONCINI, G. The arachidonic acid effect on platelet nitric oxide level. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 14, 2009.

SILVA, C.D. ***Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae) – Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos**. 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia): Departamento de Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2000.

SIMÕES, V.N. e MINGUZZI, S. Estudo fitoquímico e testes biológicos das folhas da *Cecropia pachystachya* Trec. **Anais do 7º ENIC**, v.1, n.1, 2011.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOLOMON, D. H.; SCHNEEWEISS, S.; GLYNN, R. J.; KIYOTA, Y.; LEVIN, R.; MOGUN, H. AND AVORN, J. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. **Circulation**, v. 109, p. 2068-2073, 2004.

SONG, H.Y.; LEE, J.A.; JU, S.M.; YOO, K.Y.; WON, M.H.; KWON, H.J.; EUM, W.S.; JANG, S.H.; CHOI, S.Y.; PARK, J. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced inflammation in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, n. 6, p. 1348-1357, 2008.

STANGE, V. S. et al. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios in vivo e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vitória, v. 19, n. 2B, p. 637-642, abr./jun. 2009.

STANLEY, P.L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSH, K.M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacology**, v. 4, p. 262-271, 1991.

SZEKANECZ, Z. e KOCH, A. E. Vascular endothelium and immune responses: implications for inflammation and angiogenesis. **Rheumatics diseases clinics of North America**, v. 30, p. 97-114, 2004.

TANAE, M.M. ; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; DE LIMA, T.C.M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. **Phytomedicine**, v. 14, p. 309–313, 2007.

UCHI, H.; TERAOKA, H.; KOGA, T.; FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**, v. 24, n. 1, p. 29-38, 2000.

VANE, J. In: Gábor M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó 11, 2000.

VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, Basel, v. 47, sup. 2, p. 78–87. 1998.

VANE, J.R. e BOTTING, R.M. Mechanism of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **American Journal of Medicine**, v. 104, n. 3A, p. 2-8, 1998.

VENTURA, T.L.B. **Atividade anti-inflamatória e antimicobacteriana de espécies vegetais ocorrentes no Brasil com ênfase em *Cecropia pachystachya* e *Vochysia divergens***. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado Biociências e Biotecnologia): Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2011.

VIEGAS JR .; BOLZANI, V.S; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEISSMAN, G. Inflammation: historical perspectives. In: Gallin J.L. et al. (Eds): **Inflammation: Basic principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, p. 5, 1992.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

WRIGHT, C.I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C.I.; KONING, M.M.G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.1, p.1-31. 2007.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmaceutical Reports**, v. 58, p. 13-21, 2006.