

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TESE DE DOUTORADO**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS COM AS ATIVIDADES  
ANTINOCICEPTIVA, ANTIEDEMATOGÊNICA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DO FLAVONOIDE MAJORITÁRIO DAS  
INFLORESCÊNCIAS DE *KALANCHOE PINNATA* (LAM.)  
PERS. (FOLHA DA FORTUNA)**

**RAQUEL TEIXEIRA FERREIRA**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**MECANISMOS ENVOLVIDOS COM AS ATIVIDADES  
ANTINOCICEPTIVA, ANTIEDEMATOGÊNICA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DO FLAVONOIDE MAJORITÁRIO DAS  
INFLORESCÊNCIAS DE *KALANCHOE PINNATA* (LAM.)  
PERS. (FOLHA DA FORTUNA)**

**RAQUEL TEIXEIRA FERREIRA**

*Sob a orientação do Professor*  
**Frederico Argollo Vanderlinde**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração Fisiologia.

Seropédica, RJ  
Junho de 2016

615.32

F383m

T

Ferreira, Raquel Teixeira, 1986-

Mecanismos envolvidos com as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-inflamatória do flavonoide majoritário das inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (folha da fortuna) / Raquel Teixeira Ferreira. - 2016.

93 f.: il.

Orientador: Frederico Argollo Vanderlinde.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2016.

Bibliografia: f. 53-80.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Ervas - Uso terapêutico - Teses. 3. Inflamação - Tratamento - Teses. 4. Dor - Tratamento - Teses. 5. Flavonóides - Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório - Teses. I. Vanderlinde, Frederico Argollo, 1950- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**RAQUEL TEIXEIRA FERREIRA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas** no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em Fisiologia.

**TESE APROVADA EM 30/03/2016**



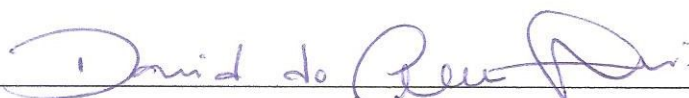
Assinatura

Professor Dr. Frederico Argollo Vanderlinde - UFRRJ  
(Orientador)



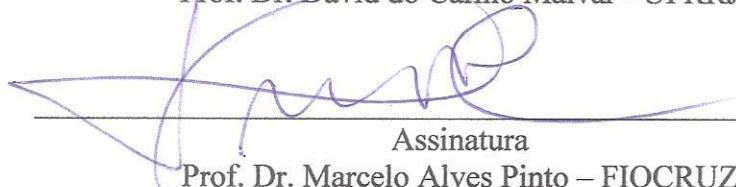
Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alba Cenélia Matos da Silva - UFRRJ



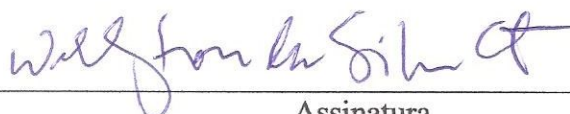
Assinatura

Prof. Dr. David do Carmo Malvar - UFRRJ



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto – FIOCRUZ



Assinatura

Prof. Dr. Wellington da Silva Côrtes - UFRRJ

## AGRADECIMENTOS

À professora Sônia Soares Costa e à Dr<sup>a</sup> Marcela Araújo Soares Coutinho, pelo fornecimento do material fitoquímico, pelas reuniões na UFRJ sempre rodeadas de bons conselhos e ideias para novos trabalhos, pela parceria por estes anos no desenvolver do projeto com a nossa KP. Não obstante, aos demais alunos e colaboradores do NPPN – Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais – da UFRJ, pelo pronto atendimento sempre que mais material era requisitado para enriquecer nossas pesquisas.

Ao professor Elson Alves Costa, “Xico”, e toda sua equipe de alunos e funcionários, especialmente à Doutoranda Iziara Ferreira Florentino, pela colaboração desde o início de nossos experimentos, ainda em meio ao Mestrado inclusive, com os ensaios de Mieloperoxidase em 2010, e nos ensaios da Cicloxigenase em 2012.

A todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas por terem me acompanhado de perto ou um pouco mais distante, observando, incentivando, apoiando e me parabenizando nas conquistas que tive durante estes 4 anos de Doutorado. Em especial ao Mestre Wellington, responsável pelo meu primeiro contato com a Farmacologia ainda nas aulas de Farmacologia I durante a graduação. Por me receber com seu carinho e atenção infinitos durante a entrevista de monitoria de Farmacologia em 2006, na qual iniciei como voluntária e permaneci como bolsista mais tarde até 2008. Muito obrigada pelos abraços acolhedores só com o olhar, sendo sempre um conforto para todos que o procuram em sua sala, independente da tarefa que esteja envolvido.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, Dione, Maria Rita, Franklin e Sr. Juca, por estarem sempre dispostos à me ajudar quando chegava na secretaria e/ou no biotério precisando daquela santa ajudinha, daquele papel pra ontem, daquela informação que não encontrava... E em especial ao Vicente, que sempre será meu braço direito, meu contador de histórias, meu amigo, ouvinte, salvador da pátria e tantas outras qualidades infinitas que não precisam ser listadas para valerem como agradecimento. Agradeço ainda à Patrícia Montezoro Fortes, aluna de apoio técnico e responsável pela colônia de camundongos, pelo pronto atendimento em nossas solicitações de animais para os experimentos.

Aos colegas de laboratório, em especial ao Felipe Marques, Marissa, Raquel Nascimento (ou Raquel “morena”/ “fisio”), ao Claudinho e à Gabriela Mastrangelo (Gabi), que me acompanharam desde o início de minha trajetória no Doutorado, me fazendo rir nas horas que eram necessárias, me salvando quando faltava algum material ou ideias de fazer funcionar um equipamento “teimoso” bem na hora do experimento e me acalmando nas horas em que o desespero ou desânimo tomavam conta... Não menos importante, às caronas desses amigos queridos que me salvaram também inúmeras vezes!

Ao David, agora professor de nosso departamento, mas desde sempre colaborador em nossos projetos e pela ativa participação e braço direito na publicação de nosso artigo científico envolvendo a KP. Pelos conselhos sempre bem pontuados, pelas ideias e incentivo nas horas dos experimentos, pelo companheirismo nas idas à Ribeirão Preto, juntamente com a Sabrina, me dando um cantinho pra ficar durante os congressos.

Ao mestre Frederico, meu orientador que me acompanha cientificamente desde 2007, quando iniciei minha Iniciação Científica já com o estudo de plantas medicinais. Pela orientação no Mestrado e agora no Doutorado, completando então 9 anos de convivência e troca de experiências, broncas e incentivos, ainda que com poucas palavras. Obrigada por tudo.

Ao meu pai Marcos, minha mãe Jandira e meu padrasto George, por estarem sempre preocupados em acompanhar meu trabalho, ainda que boa parte dele seja, para eles, ainda um incógnita. Pelas vibrações positivas sempre que ficavam sabendo de uma apresentação oral, pela torcida sempre que um experimento estava pra começar, pelo interesse em tentarem me ajudar até com a análise dos dados, ficando confusos e interessados com os gráficos que surgiam ao longo do tempo. Por terem ficado ansiosos pela conclusão de mais esta etapa, perguntando a cada mês e incansavelmente: “quando termina o doutorado?” E principalmente, por nunca deixarem de acreditar em mim, mesmo nas horas que eu me questionava se conseguiria.

Aos meus avós, Wilma e Nelson, pelo carinho de sempre, por se preocuparem se eu estava me alimentando bem, se eu iria sair pra “estudar” mesmo na chuva, no calor, de noite... Por me darem os parabéns até quando eu “passava numa matéria” no semestre.... Por entenderem cada um à seu modo o quanto esta fase era importante pra mim como pessoa e profissional.

Aos meus amigos, que aprenderam que existem diferenças entre ratos e camundongos, não só o tamanho! Que ouviram incansavelmente minhas preocupações durante as disciplinas, experimentos, tentativas de publicação do artigo, final da bolsa... Muito obrigada!

## RESUMO

FERREIRA, Raquel Teixeira. **Mecanismos envolvidos com as atividades antinociceptiva, antiedematogênica e anti-inflamatória do flavonoide majoritário das inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (folha da fortuna)**. 2016. 80p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

*Kalanchoe pinnata* (KP) é popularmente utilizada para tratamento de doenças inflamatórias. Este estudo investigou o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso das inflorescências de KP (EAFL), a fração acetato de etila (FAcOEt), a fração butanólica (FBuOH), a fração aquosa (FAq) e o flavonoide majoritário [quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo] (KPFV) de KP, assim como possíveis mecanismos de ação. Camundongos albinos, machos (25-35g) foram pré-tratados com EAFL (30-300 mg/kg, *s.c.*), produzindo inibição dose dependente das contorções induzidas por ácido acético (DI<sub>50</sub> 164,8 mg/kg), e a administração subcutânea de EAFL (300 mg/kg), FAcOEt (12 mg/kg) ou FBuOH (15 mg/kg) reduziu a migração leucocitária na pleurisia induzida por carragenina em camundongos em 56,1%, 47,3%, 39,6% e 43,1%, respectivamente. Em doses até 240 vezes menores que o EAFL, KPFV (0,3-3,0 mg/kg, *s.c.*), também foi capaz de inibir a migração leucocitária (DI<sub>50</sub> 1,78 mg/kg). No teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos, EAFL (3-30 mg/kg, *s.c.*) e KPFV (0,3-3,0 mg/kg, *s.c.*) apresentaram atividade antiedematogênica dose dependente (EAFL - DI<sub>50</sub> 4,3 mg/kg, KPFV - DI<sub>50</sub> 0,76 mg/kg). O tratamento com EAFL reduziu a concentração de MPO e de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural obtido do teste da pleurisia induzida por carragenina, enquanto o KPFV inibiu ambas as isoformas de ciclooxigenase (COX), com CI<sub>50</sub>  $3,8 \times 10^{-5}$ M (22,1  $\mu$ g/mL) para COX-1 e um máximo de inibição da COX-2 de 43,5% (CI<sub>50</sub>  $>8,4 \times 10^{-5}$ M ou 50  $\mu$ g/mL). O índice de seletividade (COX-1 CI<sub>50</sub>/COX-2 CI<sub>50</sub>) foi  $< 0,44$ . Estes resultados indicam que EAFL e KPFV produziram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva envolvendo a inibição da COX e a redução de TNF- $\alpha$ . Este estudo revela que o principal flavonoide presente nas inflorescências e folhas de KP possui papel importante no uso etnomedicinal desta espécie nos processos de natureza inflamatória.

**Palavras-chave:** *Kalanchoe pinnata*, Anti-inflamatório, Flavonoide.

## ABSTRACT

FERREIRA, Raquel Teixeira. **Mechanisms underlying the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activity of the main flavonoid from *Kalanchoe pinnata* flowers (Lam.) Pers. (fortune sheet).** 2016. 80p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2016.

*Kalanchoe pinnata* (KP) is popularly used for treating inflammatory diseases. This study investigated the antinociceptive and anti-inflammatory potential of the KP flower aqueous extract (KPFÉ), the ethyl acetate (EtOAcF), butanol (BuOHF) and aqueous (AqF) fractions and the main flavonoid [quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside] (KPFV) of KP, as well as possible mechanisms of action. Swiss albino mice, male (25-35g) were pretreated with KPFÉ (30-300 mg/kg, *s.c.*) producing dose-related inhibition of acetic acid-induced writhing (ID<sub>50</sub> 164.8 mg/kg), and the subcutaneous administration of KPFÉ (300 mg/kg), EtOAcF (12 mg/kg), BuOHF (15 mg/kg) or AqF (210 mg/kg) reduced leukocyte migration on carrageenan-induced pleurisy in mice at 56.1%, 47.3%, 39.6% and 43.1%, respectively. At doses of up to 240 times smaller than KPFÉ, KPFV (0.3-3.0 mg/kg, *s.c.*), also inhibited leukocyte migration (ID<sub>50</sub> 1.78 mg/kg). In croton oil-induced ear edema in mice, KPFÉ (3-30 mg/kg, *s.c.*) and KPFV (0.3-3.0 mg/kg, *s.c.*) presented dose-related anti-edematogenic activity (KPFÉ - ID<sub>50</sub> 4.3 mg/kg, KPFV - ID<sub>50</sub> 0.76 mg/kg). Treatment with KPFÉ reduced the MPO and TNF- $\alpha$  concentration in the pleural exudates on carrageenan-induced pleurisy test, while KPFV inhibited both isoforms of cyclooxygenase (COX), with IC<sub>50</sub>  $3.8 \times 10^{-5}$  M (22.1  $\mu$ g/mL) for COX-1 and a maximum COX-2 inhibition of 43.5% (IC<sub>50</sub>  $>8.4 \times 10^{-5}$  M or 50  $\mu$ g/mL). The selectivity index (COX-1 IC<sub>50</sub>/COX-2 IC<sub>50</sub>) was  $<0.44$ . These results indicate that KPFÉ and KPFV produced anti-inflammatory and antinociceptive activity through the COX inhibition and TNF- $\alpha$  reduction. This study reveals that the main flavonoid in KP flowers and leaves plays an important role in the ethnomedicinal use of this species for healing inflammatory processes.

**Key word:** *Kalanchoe pinnata*, Anti-inflammatory, Flavonoid.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Esquema ilustrativo da definição de plantas medicinais e suas subdivisões em grupos específicos.

**Figura 2A e 2B.** Flores de *Kalanchoe daigremontiana*. Formato de sino, flores pendulares e cores que variam de vermelho a roxo; **Figura 2C.** Flor de *Kalanchoe pinnata*. Formato de sino característico do gênero, demonstrando flor com cores amarela e vermelha mescladas

**Figura 3.** Propagação da planta a partir da margem foliar (foco nos círculos vermelhos), ponto de crescimento de novas folhas.

**Figura 4.** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Demonstração da planta com todos os componentes: algumas folhas, flores e caule.

**Figura 5.** Principais mediadores liberados por fatores celulares e plasmáticos durante o processo inflamatório.

**Figura 6.** Transmigração leucocitária.

**Figura 7.** Cascata inflamatória e geração de prostanoídes a partir do ácido aracídico. PLA<sub>2</sub> = fosfolipase A<sub>2</sub>; COX = cicloxigenase; PG = prostaglandina; TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub> = prostaciclina I<sub>2</sub>; CMLVs = células de músculo liso vascular. Quadros em rosa contêm os tipos e subtipos de receptores para cada prostanoide.

**Figura 8.** Alvos celulares do TNF- $\alpha$ .

**Figura 9.** Esquema ilustrativo dos sítios de ligação das cicloxigenases 1 e 2. Nota-se a diferença nos sítios de ligação de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) nas duas isoformas (A), com a presença de um “bolso lateral” na COX-2 (à esquerda na estrutura) que torna seu sítio catalítico maior e permite a interação com estruturas de grupamentos químicos mais volumosos (B).

**Figura 10.** Mediadores periféricos da inflamação. Os danos teciduais levam à liberação de mediadores inflamatórios pela ativação de nociceptores ou células não-neuronais residentes ou infiltradas na área afetada, como: mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. As moléculas de sinalização incluem: serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, CGRP, bradicinina, eicosanóides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinóides, NGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), proteases extracelulares e prótons. Estes fatores se ligam aos respectivos receptores na superfície celular dos nociceptores.

**Figura 11.** Esquema geral de obtenção dos flavonóides e seu processamento analítico. A partir das inflorescências de KP obteve-se o extrato aquoso, o qual foi precipitado em etanol (1:1) e posteriormente particionado em acetato ou butanol. As frações geradas pela partição foram processadas por cromatografia em coluna, identificando-se diversos flavonóides (KP1-KP5).

**Figura 12.** Esquema ilustrativo mostrando as etapas para isolamento dos flavonóides (em verde estão indicados os rendimentos dos compostos) da *Kalanchoe pinnata*.

**Figura 13.** Cronologia experimental do teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

**Figura 14.** Cronologia experimental do teste da pleurisia induzida por carragenina.

**Figura 15.** Cronologia experimental do teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.

**Figura 16.** Efeito dos tratamentos por via oral com o EAFL (500 mg/kg, 1 g/kg e 2 g/kg) ou com o meloxicam (Melox.) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  significativamente diferente do grupo veículo.  $\#p<0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 8 camundongos.

**Figura 17.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o EAFL ou com a indometacina (Indo) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.  $***p<0,001$  significativamente diferente do grupo veículo.  $##p<0,01$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 a 6 camundongos.

**Figura 18.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o KPFV ou com a indometacina (Indo) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo.  $\#p<0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 a 6 camundongos.

**Figura 19.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o EAFL, suas frações (FAcOEt, FBuOH e FAq) ou com a dexametasona (Dexa) no número de leucócitos migrados para a cavidade pleural na pleurisia induzida por carragenina.  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

**Figura 20.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o flavonoide KPFV ou com a dexametasona (Dexa) no número de leucócitos migrados para a cavidade pleural na pleurisia induzida por carragenina.  $*p<0,05$  e  $***p<0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo.  $##p<0,01$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

**Figura 21.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFL ou com a indometacina na concentração da mieloperoxidase no lavado pleural na pleurisia induzida por carragenina.  $**p<0,01$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

**Figura 22.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFL ou com a dexametasona (Dexa) sobre a diferença de peso ( $\Delta$ ) entre as orelhas direita (óleo de cróton, 2,5%) e esquerda (acetona) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.  $*p<0,05$ ,  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-11 camundongos.

**Figura 23.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o flavonoide KPFV ou com a dexametasona (Dexa) sobre a diferença de peso ( $\Delta$ ) entre as orelhas direita (óleo de cróton, 2,5%) e esquerda (acetona) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.  $**p<0,01$  e  $***p<0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo.  $\#p<0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-11 camundongos.

**Figura 24.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFV ou com a dexametasona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural, determinada por ELISA.  $***p<0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

**Figura 25.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o KPFV ou com a dexametasona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural, determinada por ELISA.  $***p<0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

**Figura 26.** Efeito do flavonoide KPFV sobre a atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2, demonstrando o índice de seletividade (IS) preferencial para COX-1.

**Figura 27.** Estrutura do flavonoide majoritário das inflorescências de KP: *quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo* (KPFV).

**Tabela 1.** Efeito do flavonoide KPFV e do controle positivo Indometacina (Indo) sobre a atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

- % – porcentagem  
± – mais ou menos  
°C – graus Celsius  
µg/mL – micrograma por mililitro  
µL – microlitro  
µm – micrômetro  
a.C. – antes de Cristo  
AA – ácido aracdônico  
AIDS / SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida  
AINE – anti-inflamatório não-esteroidal  
ANOVA – análise de variância  
FAq – Fração aquosa das inflorescências de *Kalanchoe pinnata*  
ATP – trifosfato de adenosina  
Aδ – A delta  
FBuOH – fração butanólica das inflorescências de *Kalanchoe pinnata*  
CAM – Crassulaceae acid metabolismo / Metabolismo ácidos das crassuláceas  
CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina  
CI<sub>50</sub> – concentração inibitória 50%  
CINC-1 – quimiocina quimioatraente de neutrófilos 1  
cm – centímetro  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono  
COX – cicloxigenase  
d.C. – depois de Cristo  
DI<sub>50</sub> – dose inibitória 50%  
DL<sub>50</sub> – dose letal 50%  
EPM – erro padrão da média  
ERO – espécies reativas de oxigênio  
FAcOEt – fração acetato de etila das inflorescências de *Kalanchoe pinnata*  
EtOH – etanol  
g – grama  
g/kg – grama por quilograma  
h – hora  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
*i.p.* – via intraperitoneal  
IASP – International Association for the Study of Pain / Associação Internacional para o Estudo da Dor  
IFN-γ – interferon gama  
IL – interleucina  
iNOS – óxido nítrico sintase induzida  
IS – índice de seletividade  
IκB – I kappa B  
K<sup>+</sup> – íon potássio  
KC – quimiocina derivada dos queratinócitos  
kDa – quilodalton  
kg – quilograma  
KP – *Kalanchoe pinnata*  
EAFL – extrato aquoso das inflorescências da *Kalanchoe pinnata*

KPFV – flavonoide majoritário das inflorescências de *Kalanchoe pinnata*  
L – litro  
LOX – lipoxigenase  
LPMN – leucócitos polimorfonucleares  
LPS – lipopolissacarídeos  
LT – leucotrieno  
M – molar  
m/s – metros por segundo  
mg – miligrama  
mg/kg – miligrama por quilograma  
mg/mL – miligrama por mililitro  
mL – mililitro  
mL/kg – mililitro por quilograma  
mm – milímetro  
MPO – mieloperoxidase  
mU/mL – microunidade por mililitro  
NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase  
NK-1 – neurocinina  
NFκB – N F kappa B  
NGF – fator de crescimento nervoso  
nm – nanômetro  
NMDA – receptor N-metil-D-aspartato  
NK – células natural killer  
n° – número  
NSP – receptores sensitivos primários  
<sup>-</sup>OCl – ânion hipoclorito  
*p* – valor de significância estatística  
*p.o.* – via oral  
*p/p* – peso/peso  
*p/v* – peso/volume  
PBS – solução tampão fosfato salina  
PG – prostaglandina  
pg/mL – picograma por mililitro  
PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGES – prostaglandina sintase  
PGI<sub>2</sub> – prostaciclina  
pH – potencial hidrogeniônico  
PKC – proteína tirosina quinase C  
PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>  
RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS  
rpm – rotações por minuto  
*s.c.* – via subcutânea  
SOD – superóxido dismutase  
SP – substância P  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TACE – TNF- $\alpha$  converting enzyme / Enzima conversora de TNF- $\alpha$   
TNFR – receptor de TNF  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
TX – tromboxano  
UI/mL – unidade internacional por mililitro

UV-B – luz ultravioleta B

v/v – volume/volume

WDR – wide dynamic range / alcance amplo e dinâmico

$\Delta$  – delta (diferença de peso entre as orelhas)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>1.1 Plantas Medicinais</b>	1
1.1.1 Histórico	3
1.1.2 Plantas como fonte de medicamentos	4
<b>1.2 A família Crassulaceae e o Gênero <i>Kalanchoe</i></b>	5
1.2.1 Constituintes químicos do gênero <i>Kalanchoe</i>	7
1.2.2 Propriedades terapêuticas da <i>Kalanchoe pinnata</i>	9
<b>1.3 Inflamação</b>	13
1.3.1 Fisiopatologia da inflamação	13
1.3.2 O ácido aracdônico e as prostaglandinas	15
1.3.3 Citocinas e quimiocinas	17
1.3.3.1 TNF- $\alpha$	18
1.3.4 Mieloperoxidase (MPO)	21
1.3.5 Cicloxigenase (COX)	21
1.4 Flavonoides	24
<b>1.5 Dor</b>	26
1.5.1 Fisiopatologia da dor	27
<b>2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	32
<b>3.1 Material Botânico</b>	32
3.1.1 Extração e Isolamento	32
<b>3.2 Drogas, Reagentes e Solventes</b>	34
<b>3.3 Animais</b>	34
<b>3.4 Métodos Farmacológicos</b>	34

3.4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva	34
3.4.1.1 Teste da das contorções abdominais induzidas por ácido acético	34
3.4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória	35
3.4.2.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina	35
3.4.2.1.1 Dosagem <i>ex vivo</i> da Mieloperoxidase	36
3.4.2.2 Teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton	36
3.4.3 Avaliação de mecanismos de ação	37
3.4.3.1 Dosagem <i>ex vivo</i> de TNF- $\alpha$	37
3.4.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	37
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	38
<b>5 RESULTADOS</b>	38
<b>5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva</b>	38
5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	38
<b>5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória</b>	40
5.2.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina	40
5.2.1.1 Dosagem <i>ex vivo</i> da Mieloperoxidase	42
5.2.2 Teste do edema de orelha induzida por óleo de cróton	43
<b>5.3. Avaliação de mecanismos de ação</b>	45
5.3.1 Dosagem <i>ex vivo</i> de TNF- $\alpha$	45
5.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	46
<b>6 DISCUSSÃO</b>	48
<b>7 CONCLUSÕES</b>	52
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	53
<b>9 ANEXO</b>	81



## 1 INTRODUÇÃO

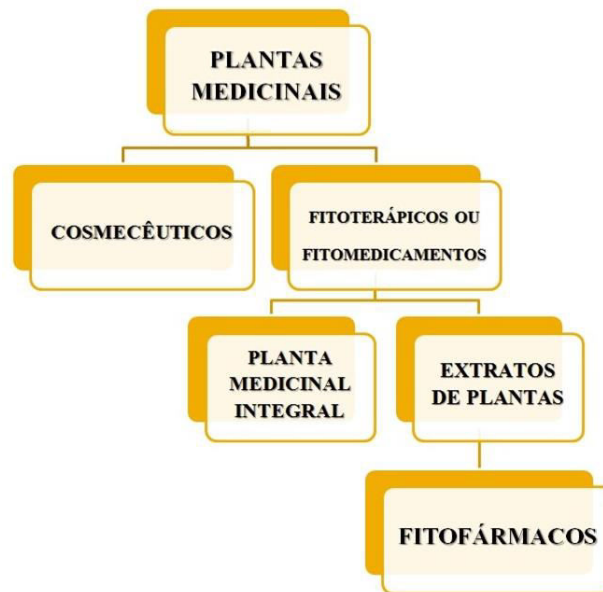
Atualmente, o mercado farmacêutico conta em sua grande maioria com substâncias sintéticas em seu arsenal terapêutico. Contudo, devido a diversos fatores, o resgate à valorização de práticas terapêuticas consideradas como populares ou não científicas tem obtido cada vez mais espaço neste mercado. Dentre as causas que podem explicar o crescimento na utilização de produtos originados de plantas medicinais estão: o uso indiscriminado e incorreto dos medicamentos sintéticos – que muitas vezes leva à (falsa) crença de que os mesmos são ineficientes –, a valorização de hábitos saudáveis pela população, a descoberta de novos princípios bioativos naturais, bem como os promissores achados científicos sobre a presença de atividades farmacológicas de espécies vegetais.

A ânsia da população em procurar sanar enfermidades utilizando plantas medicinais pode, contudo, acarretar inúmeros efeitos adversos uma vez que este uso geralmente baseia-se no empirismo. Em contrapartida, grandes centros de pesquisa já utilizam métodos de isolamento e síntese cada vez mais modernos a fim de produzir novos fármacos. Para isto, utilizam-se de inúmeras substâncias classificadas como responsáveis pelos princípios ativos de plantas medicinais de uso popular. Vale ressaltar, contudo, que cada planta pode ser constituída de múltiplos princípios ativos que podem atuar em sinergia, sendo o resultado do conjunto muitas vezes mais potente e, por este motivo, com possibilidade de mais efeitos adversos indesejáveis (ARCOLINE, 2003; PANOSSIAN *et al.*, 2013).

Desta forma, embora tratamentos à base de fitoterápicos venham demonstrando cada vez mais a sua eficácia, faz-se necessário a busca de novas informações através de trabalhos científicos para comprovar e garantir que a espécie vegetal utilizada tenha o resultado esperado aliado à segurança terapêutica necessária a um medicamento.

### 1.1 Plantas Medicinais

Por definição, plantas medicinais são aquelas que têm atividade biológica de interesse terapêutico, possuindo um ou mais princípios ativos, úteis à saúde humana, podendo também serem utilizadas como cosméticos, com denominação de cosmecêuticos. Os fitoterápicos ou fitomedicamentos são produtos originados exclusivamente de material botânico integral ou de seus extratos, usados com o propósito de tratamento médico (FERREIRA *et al.*, 1998). O fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos de fase 3 (BRASIL, 2010). Os fitoterápicos podem ser divididos em plantas medicinais e extratos de plantas. Os fitofármacos são substâncias medicamentosas isoladas de extratos de plantas, como a rutina e a pilocarpina, que são alguns dos raros fitofármacos produzidos no Brasil (FERREIRA *et al.*, 1998).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo da definição de plantas medicinais e suas subdivisões em grupos específicos.

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidades terapêuticas, objetivando prevenir, atenuar ou curar estados patológicos. A palavra fitoterapia é formada por dois radicais gregos: fito vem de “*phyton*” que significa planta, e terapia vem de “*therapia*”, que significa tratamento, ou seja, tratamento em que se utilizam plantas medicinais (FERREIRA *et al.*, 1998). O princípio da fitoterapia está baseado na alopatia, caracterizado pelo uso de preparados tradicionais padronizados, eficazes, com qualidade controlada, elaborados a partir de plantas medicinais, diferenciando-se de substâncias quimicamente definidas, isoladas, purificadas e de estrutura molecular definida (DI STASI, 1995).

Apesar do avanço da tecnologia, que constantemente sintetiza novos compostos para uso terapêutico, as plantas continuam sendo fonte importante de matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos (SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Visando garantir a qualidade dos produtos fitoterápicos desde a matéria-prima até o produto acabado e assegurando ao consumidor produtos padronizados em condições apropriadas para o uso, o Ministério da Saúde do Brasil, por intermédio da Secretaria de Vigilância Sanitária, publicou em 31 de janeiro de 1995 a Portaria nº 06. Ela instituiu e normatizou no país tanto o registro de fitoterápicos, quanto à regulamentação dos procedimentos de sua produção (MIRANDA, 2001).

Em termos mundiais, existe um interesse cada vez mais pronunciado pela fitoterapia, especialmente no que diz respeito a espécies já utilizadas na medicina popular. Isto se justifica pelos mais de 25.000 compostos fitoquímicos que possuem efeitos biológicos conhecidos (GORDALIZA, 2007). A ampla possibilidade de se atingir sítios terapêuticos utilizando-se derivados de produtos naturais (NASRI; SHIRZAD, 2013) aumenta ainda mais a necessidade de estudos aprofundados sobre a atividade biológica destas plantas, a fim de correlacionar o uso popular destas espécies com seus fitoconstituintes (MILAD *et al.*, 2014).

### 1.1.1 Histórico

A utilização de plantas na prevenção e cura de doenças é muito antiga e data dos primórdios da civilização, sendo que muitas delas foram ou ainda são utilizadas com diversos fins terapêuticos (MESQUITA, 2002), fazendo parte de sistemas da medicina tradicional amplamente utilizada por vários grupos étnicos (GURIB-FAKIM, 2006). Na verdade, a utilização de recursos naturais provavelmente antecede o *Homo sapiens* moderno, tendo sido encontradas evidências em escavações do Paleolítico mostrando que o conhecimento de plantas medicinais existe pelo menos há 60.000 anos (SUMNER, 2000). Pólen e fragmentos de flores de diversas plantas foram encontrados no sítio arqueológico do homem de Neanderthal no Iraque. Dentre as espécies identificadas, estavam: *Ephedra*, *Centaurea*, *Senecio*, *Althea* e *Achillea* (TYLER, 2000).

No papiro de Edwin Smith (1700 a.C.) estão descritos tratamentos dos feridos de guerra com a aplicação de uma combinação de mel e unguentos sobre as feridas (LIMA, 1994). No papiro de Ebers (1555 a.C.), do Egito Antigo, estão relacionadas 160 plantas, muitas das quais ainda estão em uso atualmente (SANTOS, 1998). Crateus (século I a.C.) publicou a primeira obra que se tem conhecimento na história – o *Rhizotomikon* – sobre plantas medicinais (MACIEL, 1997).

Somente com os estudos de Pedânios Dioscórides (40-90 d.C.), durante o reinado de Nero, foi observado um avanço nos estudos das plantas medicinais (YAMADA, 1998). As propriedades, usos e cultivos de 600 plantas medicinais foram reunidos no “*De Materia Medica*” no primeiro século depois de Cristo. Viajando como cirurgião junto com o exército de Nero, Dioscórides pôde espalhar suas experiências com as plantas medicinais europeias. Ele defendeu o uso do salgueiro (*Salix alba*) no tratamento da gota, prática que seria utilizada para o tratamento da dor nos próximos séculos, antecedendo o uso da aspirina em 1899 pela companhia alemã Bayer (SUMNER, 2000).

Desde o início do século XVI a noção básica do entendimento de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica e a resposta terapêutica como potencial característico de uma espécie vegetal era acreditada por Paracelso. Este físico suíço pode ser considerado o introdutor de substâncias químicas no preparo de medicamentos, sob a forma de extratos alcoólicos e de tinturas, com utilização do ópio, do enxofre, do mercúrio, do ferro, do arsênico, do sulfato de cobre e do sal, procedendo portanto como um verdadeiro farmacologista. Neste período, começou a praticar a extração de substâncias bioativas que foram denominadas “Quinta Essentia”, representando provavelmente a primeira noção de princípio bioativo (ALMEIDA, 2003).

As primeiras substâncias químicas foram isoladas de extratos vegetais a partir do século XIX, quando várias substâncias bioativas foram isoladas (MACIEL *et al.*, 2002a; 2002b). Friedrich Serturmer isolou a morfina da *Papaver somniferum* em 1806. Devido ao aumento do conhecimento das substâncias químicas ativas, o primeiro fármaco sintético baseado em um produto natural foi formulado em meados do século XIX. Em 1839, o ácido salicílico foi identificado como substância ativa em várias plantas conhecidas por suas ações analgésicas, e foi, pela primeira vez, sintetizado em 1853 levando ao desenvolvimento da aspirina, que se encontra entre os medicamentos sintéticos mais utilizados até os dias atuais (KONG *et al.*, 2003).

Atualmente, sabe-se que o poder das plantas em curar é na verdade proveniente da sua composição e das características das substâncias que sintetizam, entretanto, muito tempo se passou até que se reconhecesse a verdadeira origem desse poder (YAMADA, 1998). A prática milenar da utilização de plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz (DI STASI, 1995).

### 1.1.2 Plantas como fontes de medicamentos

As plantas medicinais representam uma reserva praticamente inexplorada de substâncias úteis à humanidade. Dentro do bioma brasileiro e sua infinidade de espécies vegetais, sabe-se que muito poucas foram avaliadas quanto às suas atividades biológicas (BRAMWELL, 2000; VERPOORTE *et al.*, 2000), significando que tais plantas medicinais ainda são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JÚNIOR *et al.*, 2005).

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente (BALUNAS; KINGHORN, 2005) ou então serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; VIEGAS *et al.*, 2006). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Apesar da transferência de conhecimento de uma geração à outra, a maior parte do uso de plantas medicinais é fundamentada no empirismo (OLIVEIRA, 2001). Muitas vezes, devido à crescente consciência ecológica e tentando-se minimizar os desconfortáveis e até nocivos efeitos adversos de fármacos sintéticos, nota-se um aumento na procura pelos produtos naturais (SANTOS, 1998; RATES, 2001). Contudo, é importante ressaltar que o uso indiscriminado de fitoterápicos torna-se um risco à população, visto que estes apresentam inúmeras propriedades terapêuticas, mas podem também ser dotados de grande toxicidade (OLIVEIRA, 2001). A análise fitoquímica de uma planta pode revelar apenas uma pequena porcentagem de seus constituintes, uma vez que as plantas contêm centenas ou milhares de metabólitos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Desta maneira, o número de trabalhos científicos em busca de novas descobertas e comprovação sobre as atividades de plantas medicinais, torna-se cada vez maior e mais promissor, sendo atualmente o grande alvo de companhias farmacêuticas e instituições de pesquisa (KONG *et al.*, 2003).

Muitos fármacos analgésicos utilizados na medicina moderna foram descobertos a partir de espécies vegetais, os quais foram gerados durante a investigação de inúmeras plantas medicinais. Um grande exemplo destes compostos é a morfina, que foi isolada em 1806, pelo farmacêutico alemão Sertüner, como um composto ativo do ópio (*Papaver somniferum*). A morfina começou a ser utilizada por volta do ano de 1850 em pequenos procedimentos cirúrgicos, em situações de pós-operatório, para o tratamento da dor crônica e como adjuvante em anestésias gerais. Alguns anos mais tarde, a codeína foi também isolada do ópio, sendo um importante agente analgésico e antitussígeno utilizado na clínica médica atual (BROWNSTEIN, 1993; BENYHE, 1994).

A espécie *Cordia verbenacea* (erva baleeira) foi alvo de extensa investigação de suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, tendo originado o primeiro anti-inflamatório sintetizado com base no extrato de uma planta nativa brasileira, conhecido como Acheflan<sup>®</sup>. Na forma de creme, o produto é indicado para dores musculares crônicas e para tendinites, e pode ser comparado com o Cataflan<sup>®</sup> (diclofenaco), outro anti-inflamatório considerado de referência para o mercado farmacêutico neste segmento (CALIXTO, 2005).

Porém, o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta dos salicilatos obtidos a partir das cascas do tronco do salgueiro (*Salix alba*, Salicaceae). Já em 400 a.C. Hipócrates costumava preparar um chá a base de folhas e cascas do salgueiro com o intuito de aliviar febres e dores de cabeça, sem saber contudo a composição da planta responsável por estes efeitos terapêuticos (KIEFER, 1997). Em outra época histórica, em caráter de curiosidade, estas cascas foram provadas pelo

reverendo Edward Stone em 1757, o qual evidenciou um sabor amargo. Após seis anos de estudo, as observações clínicas de Stone levaram a resultados evidenciando propriedades analgésicas e antipiréticas desta planta (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001), e em 25 de Abril de 1763 ele enviou uma carta do Lord Macclesfield, presidente da Royal Society, relatando sua descoberta. Em 1828, em meio à disputa entre a França e a Alemanha pela busca do princípio ativo da *S. alba*, Johann Buchner, trabalhando no Instituto de Farmacologia de Munique, foi capaz de isolar uma pequena quantidade de uma substância amarelada, amarga e em forma de cristais, a qual nomeou salicina (VIEGAS *et al.*, 2006; CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008). A partir da salicina foi realizada a primeira modificação estrutural, originando o ácido salicílico em 1839, utilizado no tratamento da artrite reumatoide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a Aspirina<sup>®</sup> (ácido acetilsalicílico) em 1897, sendo um dos fármacos anti-inflamatórios mais antigos e ainda utilizado na terapêutica médica atual (VIEGAS *et al.*, 2006). A espécie *Salix alba* está entre outras 71 espécies, como por exemplo a *Kalanchoe pinnata*, relacionadas na RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (RENISUS, 2009).

## 1.2 A família Crassulaceae e o Gênero *Kalanchoe*

A família Crassulaceae, também conhecida como Sedaceae (MILAD *et al.*, 2014), engloba cerca de 1300 espécies espalhadas pelas regiões do mundo (CARMO, 1947). Esta família, do ponto de vista botânico, abrange importantes gêneros de plantas suculentas, com várias espécies conhecidas no paisagismo. A maior parte dos membros desta família destaca-se por sua estrutura xeromórfica, isto é, por possuírem em seu tecido um compartimento que é capaz de estocar e, por conseguinte, inibir a perda de água tanto nas folhas quanto no caule (BAILEY, 1953; HILL, 1998). O caule destas espécies é constituído de células de paredes finas que se aprofundam pela epiderme, no tecido sub-dermal ou até mesmo em camadas mais profundas. Pela disposição destes tecidos, toda a estrutura torna-se impregnada por resina, formando uma fina camada no caule que é capaz de reduzir a evaporação de líquidos em algumas espécies de *Kalanchoe*, (METCALEF; CHALK, 1950; BAILEY, 1953), como a *Kalanchoe pinnata*, que assim como outras espécies do mesmo gênero é nativa de Madagascar. Outro exemplo de adaptação fotossintética de espécies deste gênero em resposta a estresses causados pela limitação hídrica é um tipo de metabolismo fotossintético conhecido como metabolismo ácido das crassuláceas (metabolismo CAM). Este fenômeno está relacionado à incorporação de CO<sub>2</sub> atmosférico durante a noite, culminando na acumulação de ácidos orgânicos durante o mesmo período (LÜTTGE, 2004).

As plantas representantes desta família são herbáceas, carnosas ou subarbustos, com folhas planas ou cilíndricas, suculentas, opostas ou verticiladas, raramente alternas, simples, ocasionalmente compostas, pinadas, sem estípulas. Possui frutos do tipo folículo, ocasionalmente cápsula. Suas raízes possuem as pontas avermelhadas, como característica geral da família Crassulaceae (BAILEY, 1953). Esta coloração é determinada pelo pigmento antocianina, o qual é intensificado pela incidência da luz (METCALEF; CHALK, 1950). De maneira geral, as crassuláceas não são plantas de aparência atrativa, pelo contrário, suas folhas tem aparência rústica e normalmente necessitam de mínimos cuidados de cultivo (BAILEY, 1953). Suas flores, contudo, possuem aparência bastante interessante, em formato pendular ou de sino, e podem apresentar cor roxo, amarelo ou vermelho (Figura 2A, 2B e 2C).



**Figura 2A e 2B.** Flores de *Kalanchoe daigremontiana*. Formato de sino, flores pendulares e cores que variam de vermelho a roxo (<http://www.ecoterrazas.com/blog/kalanchoe-daigremontiana-el-aranto-prodigioso>); **Figura 2C.** Flor de *Kalanchoe pinnata*. Formato de sino característico do gênero, demonstrando flor com cores amarela e vermelha mescladas (<http://pixabay.com/pt/planta-de-goethe-flor-269758>).

O nome *Kalanchoe* foi empregado pela primeira vez por Michel Adanson em 1753, durante uma longa viagem de exploração ao Senegal que resultou na publicação de "*Histoire Naturelle du Sénégal*" em 1757 e, em 1763, "*Les Familles Naturelles des Plantes*". Na China, país indicado por Adanson como de origem do gênero, usa-se um nome o qual tem transcrição fonética de "Kalan Chauhuy", que significa: "que cai e que cresce", em referência à forma de propagação dos embriões foliares da planta a partir da margem (ALLORGE-BOITEAU, 1996) (Figura 3).



**Figura 3.** Propagação da planta a partir da margem foliar (foco nos círculos vermelhos), ponto de crescimento de novas folhas (Cortesia da Dr<sup>a</sup> Marcela Araújo Soares Coutinho; NPPN / UFRJ).

No Brasil, espécies da família Crassulaceae ocupam lugar de destaque, uma vez que são empregadas na medicina popular devido às comprovadas propriedades balsâmicas. As mais conhecidas são as dos gêneros *Kalanchoe*, *Sedum* e *Bryophyllum*. As espécies pertencentes a estes gêneros são conhecidas no Brasil por: bálsamo, saião, folha-de-fortuna, folha-da-costa, folha-da-bahia, coirama-branca, coerama, coerama-de pernambuco, paratudo-de-alagoas. Em se tratando da *Kalanchoe*, no total este gênero compreende cerca de 125 espécies (ALLORGE-BOITEAU, 1996; MILAD *et al.*, 2014).

A espécie *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Figura 4) foi primeiramente descrita pelo naturalista francês Jean-Baptiste Pierre Antoine de Monet de Lamarck. É uma erva perene, suculenta que possui folhas opostas, longo-pecioladas, simples, crenadas, carnudas, com adorno avermelhado e com cerca de 18 cm de comprimento, sendo o caule comprido e oco. Suas flores são roxas ou amarelas, pendentes, em formato de sino e em cachos. Possui reprodução vegetativa mediada por embriões foliares nas margens das folhas (ALLORGE-BOITEAU, 1996). É nativa dos trópicos do Velho Mundo e cultivada no sul da Flórida, Bermudas, Bahamas, China, Austrália, oeste da Índia e América tropical (BALZER, 1949; KAMBOJ; SALUJA, 2009). Esta é a única espécie de *Kalanchoe* encontrada na América do Sul, sendo popularmente conhecida como saião roxo, coirama vermelha ou folha da fortuna.

A espécie apresenta as seguintes sinonímias botânicas: *Bryophyllum pinnatum* Kentz. (segundo reclassificação feita pelo naturalista alemão Lorenz Oken), *Bryophyllum calycinum* Salisb., *Bryophyllum germinans*, *Cotyledon rhizophylla*, *Cotyledon calyculata*, *Cotyledon calycina*, *Cotyledon pinnata*, *Crassula pinnata*, *Kalanchoe brevicalyx*, *Kalanchoe calcicola*, dentre outros. A *Kalanchoe pinnata* é a espécie mais pesquisada do gênero *Kalanchoe*, tendo sido relatados estudos químicos, toxicológicos e farmacológicos para a mesma.



**Figura 4.** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Demonstração da planta com todos os componentes: algumas folhas, flores e caule (Cortesia da Dr<sup>a</sup> Marcela Araújo Soares Coutinho; NPPN /UFRJ).

### 1.2.1 Constituintes químicos do gênero *Kalanchoe*

Sabe-se que diversos fatores influenciam na constituição química de uma espécie vegetal, dentre eles a composição do solo, a ação de raios ultravioleta, a quantidade de CO<sub>2</sub> ofertada e até mesmo a estação do ano no qual a planta é coletada (MUZITANO *et al.*, 2011; CEUSTERS *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015a; NASCIMENTO *et al.*, 2015b).

Conseqüentemente, variam também os potenciais biológicos de acordo com a presença e a quantidade de um ou outro composto. As plantas do gênero *Kalanchoe* são normalmente encontradas em solos ricos em matéria orgânica e umidade (ARANSIOLA *et al.*, 2014), justificando a ampla gama de constituintes químicos nas mesmas. Recentes estudos com uso de suplementação de luz azul mostram que o perfil fitoquímico da espécie *Kalanchoe pinnata* pode ser modificado, aumentando assim algumas capacidades biológicas de maneira significativa (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

Diversos autores isolaram e identificaram vários componentes de diferentes espécies de *Kalanchoe*. Estes compostos podem ser classificados nos seguintes grupos: flavonoides glicosilados, alcaloides, antocianinas, cumarinas, triterpenoides, fenantrenos, lipídeos, esteroides e ácidos graxos (MARRIAGE; WILSON, 1971; GAIND; GUPTA, 1972; 1974; SHARMA; PRIYANKA, 2011; MILAD *et al.*, 2014). Suas folhas contêm um grupo de substâncias químicas denominadas bufadienolídeos, que são extremamente ativas e tem despertado o interesse da comunidade científica. Estas substâncias são bastante similares, do ponto de vista estrutural e de atividade, a dois glicosídeos cardíacos: digoxina e digitoxina, que são drogas utilizadas na clínica para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva e condições afins. Em pesquisas clínicas, os bufadienolídeos de KP têm demonstrado atividades antibacteriana, antitumoral, preventiva do câncer e inseticida (SHARMA; PRIYANKA, 2011).

Outras substâncias já encontradas no gênero *Kalanchoe* incluem: ácido aracdônico, astragalina, ácido beénico, amirina beta, benzenoides, beta-sitosterol, briofolona, briofolona, briofilina, briofilina A-C, briofilol, briofinol, briotoxina C, bufanolídeos, ácido cafeico, campesterol, cardenolídeos, ácido cinâmico, clerosterol, clionasterol, codisterol, ácido cumárico, epigalocatequina, ácido ferúlico, friedelina, glutinol, hentriacontano, isofucosterol, kaempferol, ácido oxálico, oxaloacetato, ácido palmítico, patuletina, peposterol, fosfoenolpiruvato, ácido protocatecóico, pseudotaraxasterol, piruvato, quercetina, esteroides, estigmasterol, ácido succínico, ácido siringico, taraxerol e triacontano (JOSEPH *et al.*, 2011). Estudos anteriores sobre a composição química de *K. pinnata* mostraram que bufadienolídeos (YAMAGISHI *et al.*, 1989), terpenoides e flavonoides (COSTA *et al.*, 1995) são os principais constituintes desta espécie. Outras classes de compostos incluem flavonoides glicosilados como a quercetina-3-L ramnosídeo-L arabinofuranosídeo, quercetina-3 diarabinosídeo e kaempferol-3-glicosídeo, muitos alcanos C25-C35 (hentriacontano-n,-n triacontano predominando) e alcanóis C 26-C 34. Triterpenoides pentacíclicos, como  $\alpha$ -amirina, b-amirina e esteróis como sitosterol também já foram isoladas a partir da fração insaponificável. Além disso, a presença de outros compostos fenólicos como o ácido p-hidroxibenzóico e ácidos orgânicos como isocítrico e ácido cítrico tem sido relatada.

Mais recentemente, além da quercetina, foram isolados a partir das inflorescências de KP quatro flavonoides glicosilados, e em estudos de Coutinho e colaboradores (2012) dois destes flavonoides foram descritos pela primeira vez na espécie *K. pinnata*: miquelianina (*quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicuronopiranosídeo*) e isoquercitrina (*quercetina 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo*). Todos os flavonoides citados neste estudo apresentaram potencial atividade contra a proliferação de células T *in vitro* (COUTINHO *et al.*, 2012), sendo esta uma característica importante de drogas imunossupressoras.

Outros autores também investigaram classes de compostos presentes na *K. pinnata*, reconhecendo alguns componentes ativos, como: fenóis, fenilpropanoides, flavonoides, triterpenoides, esteroides, saponinas e alcaloides (OKWU; JOSIAH, 2006; KAMBOJ; SALUJA, 2009; PRASAD *et al.*, 2012; AFZAL *et al.*, 2012b). Devido a esta enorme diversidade química, a atividade anti-inflamatória de KP tem sido atribuída ao sinergismo entre flavonoides (quercetina, kaempferol, rutina e luteolina), triterpenoides e esteroides ( $\alpha$ - e



$\beta$ -amyrinandstigmast-4,20(21),23-trie-3-one) (QUAZI MAJAZ *et al.*, 2011b; SIMÃO DA SILVA *et al.*, 2011; AFZAL *et al.*, 2012a, 2012b).

### 1.2.2 Propriedades terapêuticas da *Kalanchoe pinnata*

*Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon é uma planta medicinal utilizada popularmente no Brasil e em outras partes do mundo para o tratamento de diversas doenças inflamatórias (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1994). É uma das espécies mais antigas introduzida nos jardins botânicos europeus, sendo considerada nativa de Madagascar e naturalizada nos trópicos. Esta espécie é a mais generalizada do gênero *Kalanchoe*, principalmente nas regiões tropicais e especialmente devido às suas propriedades medicinais (BOITEAU; ALLORGE-BOITEAU, 1995).

O uso extensivo desta planta medicinal na terapia complementar e alternativa tem sido amplamente divulgado, principalmente em relação às folhas, para o tratamento de inflamações, cicatrização e úlceras (MORS *et al.*, 2000). Diversas outras indicações populares envolvem a *K. pinnata*, e até o presente momento podemos encontrar vários artigos de revisão que listam estas propriedades. Dentre elas estão: ação contra dor, gastrite, diarreia, dismenorria, desordens hepáticas, febre, infertilidade feminina, infecções urinárias, picadas de cobra e escorpião, lepra, tosse, asma, cálculos renais, artrite e doenças cardiovasculares (HUTCHINGS *et al.*, 1996; VAN WYK *et al.*, 1997; BISWAS *et al.*, 2011; QUAZI MAJAZ *et al.*, 2011a; MILAD *et al.*, 2014).

Ao redor do mundo, o uso da KP geralmente está relacionado com a prevalência das enfermidades do local. Por exemplo, em algumas partes do sul, oeste e centro de províncias de Camarões, a medicina popular considera as folhas de *Kalanchoe pinnata* como um remédio útil contra a hipertensão, atividade que foi inclusive comprovada por Bopda e colaboradores recentemente, em estudos envolvendo dieta rica em sódio em ratos (BOPDA *et al.*, 2014). No sudeste da Nigéria, esta erva é utilizada para facilitar o desprendimento placentário após a parturição. Suas folhas são usadas externamente para combater fungos de pele (MISRA; DIXIT, 1979), bem como em forma de infusões para tratamento da febre. É também utilizada para bronquite aguda e crônica, pneumonia e outras formas de infecções do trato respiratório, como a asma. Esta planta é ainda considerada diurética e supressora da tosse. No Brasil, existem relatos de seu uso na doença periodontal, queilite (inflamação nos lábios), lábios rachados em crianças, equimoses e feridas (MOURÃO *et al.*, 1999). É utilizada ainda para picada de insetos na Índia e Sri Lanka (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1994), infecções de ouvido e desinteria na Nigéria (AKINPELU, 2000), febre, abscessos, tosse, doenças de pele e como citotóxica (KUO *et al.*, 2008), cólera, doenças urinárias, panarício (inflamação nas unhas) na África e Ásia (SIDDIQUI *et al.*, 1989), injúrias teciduais (LIU *et al.*, 1989) artrite e úlceras gástricas (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1994) no Taiwan. As folhas trituradas são esfregadas ou colocadas sobre a testa a fim de trazer alívio para dores de cabeça na África (AKINPELU, 2000), reumatismo na Indonésia (SUPRATMAN *et al.*, 2001a), tratamento de infecções pulmonares, artrite reumatoide, como imunomoduladora e contra úlceras gástricas. A KP é também amplamente utilizada como adstringente, analgésico e para controle da náusea e vômito (QUAZI MAJAZ *et al.*, 2011a). Na medicina tradicional africana é utilizada contra otites, dores de cabeça, inflamações, convulsões e debilidades de uma maneira geral (NGUELEFACK *et al.*, 2006). Também é relatado o uso da espécie como um potente anti-histamínico (PAL *et al.*, 1999), e para o tratamento de cálculos renais, úlceras gástricas e edema de membros (OKWU; NNAMDI, 2011).

Cientificamente, diversas atividades farmacológicas da *K. pinnata* já foram reportadas e comprovadas (SUPRATMAN *et al.*, 2001b; YADAV; DIXIT, 2003; AFZAL *et al.*, 2012b),

como a atividade antidiabética, antioxidante, antineoplásica, imunomodulatória, antilipídêmica, antialérgica, antiviral, antitumoral, hepatoprotetora (YADAV; DIXIT, 2003), atividade anticolinesterásica contra larvas de *Aedes aegypti* (TREVISAN *et al.*, 2006), antifúngica, bactericida, analgésica (ROSSI-BERGMANN *et al.*, 1997), gastroprotetora, antitrombótica, hipotensora (OJEWOLE, 2005), antiurólitos (SHUKLA *et al.*, 2014; PHATAK; HENDRE, 2015) imunossupressora (ALMEIDA *et al.*, 2000) e relaxante muscular (PLANGGER *et al.*, 2006).

A atividade anti-inflamatória de extratos de KP foi descrita em diferentes modelos de inflamação (HEMA *et al.*, 1986; PAL; CHAUDHURI, 1990; 1991), sendo esta atribuída, pelo menos em parte, ao sitosterol e a álcoois alifáticos. Uma subfração do macerado em metanol das folhas frescas desta planta apresentou atividade antiulcerogênica em nove modelos experimentais diferentes, tais como lesão gástrica induzida por aspirina, indometacina, serotonina, reserpina, estresse, etanol e ácido acético em ratos, bem como lesão gástrica induzida por ácido acetilsalicílico em porcos da Índia (PAL; CHAUDHURI, 1990; 1991). A utilização de suas folhas com objetivos anti-inflamatórios e antissépticos, a fim de tratar tosse, úlceras e feridas foi relatada em estudos recentes (EL ABDELLAOUI *et al.*, 2010; CHIBLI *et al.*, 2014), sendo identificados compostos já relatados na literatura, mas também novos, através da identificação de moléculas com atividade antimicrobiana de extratos vegetais.

Foi relatada a capacidade desta planta em modular o sistema imunológico (ALMEIDA *et al.*, 2000). Este estudo fornece evidências de que os ácidos graxos presentes na *Kalanchoe pinnata* podem ser responsáveis, pelo menos em parte, por seu efeito imunossupressor *in vivo*. A atividade antitumoral do extrato das folhas da KP foi investigada no estudo de Supratman e colaboradores (2001a). Neste estudo, cinco bufadienolídeos foram isolados deste extrato, sendo observado efeitos inibitórios na ativação do antígeno viral Epstein-Barr, encontrado nas células induzidas pelo promotor do tumor (*12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate*). Estes compostos isolados do extrato da KP mostraram-se como potentes agentes quimiopreventivos para o câncer (SUPRATMAN *et al.*, 2001a).

O estudo de Biswas e colaboradores (2011) investigou os efeitos do extrato aquoso das flores da KP na pressão sanguínea de gatos anestesiados, bem como a condição geral dos rins e fígados de coelhos. Os resultados revelaram que houve leve alteração da pressão sanguínea dos gatos, com uma redução do efeito hipertensor induzido pelo uso da adrenalina.

Efeitos neurofarmacológicos também foram investigados para o extrato das folhas da KP em camundongos. Observou-se intensa diminuição da atividade exploratória de forma dose-dependente, bem como efeito sedativo marcante no comportamento destes animais, com potencialização do tempo de sono induzido por barbitúricos. Além disto, este extrato retardou o tempo de indução de convulsões induzidas por estriçnina e picrotoxina, indicando que o extrato possui ação depressora central no sistema nervoso central (SALAHDEEN; YEMITAN, 2006).

Foram realizados ainda estudos biológicos com relação a propriedade antiofídica de duas espécies de *Kalanchoe*: *K. brasiliensis* e *K. pinnata*. Ambas as espécies inibiram (*in vitro*) a enzima fosfolipase do veneno de *Bothrops jararaca*, sendo que a *K. pinnata* mostrou-se mais ativa que a *K. Brasiliensis*. Além disto, as duas espécies foram capazes de reduzir significativamente a atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *B. jararaca*, apresentando inclusive efeito antiedematogênico significativo e comparável ao do anti-inflamatório esteroide dexametasona (FERNANDES, 2015).

Uma atividade interessante de KP é a inibição da contratilidade do músculo detrusor na vesícula urinária de porcos. Esta ação foi observada em estudo de Schuler e colaboradores (2012), como uma nova opção de tratamento para uma enfermidade conhecida como bexiga hiper-reativa. Dada a proximidade de composição de tecidos humanos com os suínos, este tipo de abordagem do uso de KP torna-se ainda mais interessante. Isto pôde ser evidenciado

em um estudo clínico no ano seguinte (BETSCHART *et al.*, 2013), o qual utilizou 20 pacientes humanos, do sexo feminino, sob tratamento por 8 dias com cápsulas manipuladas contendo extratos de KP. Quando comparadas ao grupo placebo, houve uma tendência à redução da micção nas pacientes tratadas com esta espécie vegetal.

Estudos realizados por Ojewole e colaboradores (2005) investigaram as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*, em doses que variaram de 25 a 800 mg/kg (*i.p.*). O efeito antinociceptivo foi observado através do teste da placa quente e do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Ambos os testes demonstraram efetividade do extrato a partir da dose de 50 mg/kg por via intraperitoneal. A atividade anti-inflamatória do extrato de KP foi investigada através do edema de pata induzido por albumina, sendo observados resultados significativos quando utilizou-se a dose de 400 mg/kg pela via oral (OJEWOLE *et al.*, 2005). Utilizando o mesmo intervalo de doses, e dando continuidade ao estudo supracitado (OJEWOLE *et al.*, 2005), foi avaliada a atividade antidiabética do extrato das folhas de KP. Neste ensaio, o efeito hipoglicêmico foi observado quando camundongos foram pré-tratados com as doses de 400 e 800 mg/kg do extrato por via oral, sendo esta última a dose responsável pela redução máxima da glicemia dos animais. Especula-se que flavonoides como os polifenóis, triterpenoides e outros constituintes químicos da espécie possam ter contribuído para estes resultados (OJEWOLE, 2005), sendo necessários estudos mais específicos para corroborar tais achados.

Não se pode negar a importância e correlação da presença de flavonoides e efeitos terapêuticos na *Kalanchoe pinnata*. Um bom exemplo é a quercitrina (*quercetina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo*), um dos constituintes biologicamente ativos obtidos a partir do extrato aquoso da KP, que demonstrou ser um potente composto leishmanicida com um perfil de baixa toxicidade. Esta foi a primeira demonstração de atividade leishmanicida proveniente de um glicosídeo flavonoide (MUZITANO *et al.*, 2006). No estudo de Quazi Majaz e colaboradores (2011b) também foi observada atividade anti-helmíntica através de extrato das raízes da KP, especialmente em concentrações maiores que 100 mg/mL e em menor tempo quando comparada a droga de referência do estudo, o citrato de piperazina. Neste mesmo estudo, a análise fitoquímica do extrato bruto da KP revelou a presença de taninos, os quais seriam responsáveis por esta atividade anti-helmíntica.

Recentemente, foi relatado o efeito protetor da *Kalanchoe pinnata* no choque anafilático fatal, onde o pré-tratamento com o extrato dessa planta protegeu camundongos contra choque anafilático fatal (CRUZ *et al.*, 2008). Considerando que compostos flavonoides inibem a liberação de histamina (KAWAI *et al.*, 2007), efeito característico de substâncias com atividades antialérgicas, parece que flavonoides como a quercetina glicosilada presente na *K. pinnata*, têm esta propriedade ativa (SHAIK *et al.*, 2006).

Flavonoides como a quercetina e formas glicosiladas deste, foram descritos e isolados das flores da KP pela primeira vez em estudo de Coutinho e colaboradores (2012), sendo demonstrada atividade destes flavonoides em inibir a mitogênese de células T murinas, bem como inibição da síntese de IL-2 e IL-4, sem causar toxicidade celular. Estes resultados demonstraram que as flores da KP podem ser uma fonte rica em flavonoides imunomodulatórios, comprovando mais uma vez sua utilização terapêutica para doenças inflamatórias.

A atividade cicatrizante do extrato das folhas de KP foi avaliada através do modelo de excisão cirúrgica em ratos. No décimo primeiro dia após a produção da ferida houve um aumento na cicatrização da área da ferida de cerca 86%, quando comparado ao grupo de animais controle (68%), sendo também confirmado através de análise histológica. Esta atividade cicatrizante pode ser atribuída a presença de glicosídeos esteroidais como, por exemplo, bufadienolideo, uma aglicona esteroide presente nesta espécie (NAYAK; MARSHALL, 2010).

Em estudo paralelo do grupo foi proposta uma alternativa terapêutica para uso em feridas da pele, através do delineamento de uma formulação farmacêutica de uso tópico contendo o extrato de folhas de KP a 6%, e outra contendo seu flavonoide majoritário (denominado KPFV nesta tese) a 0,15%. Em ensaios de cicatrização em ratos, ambos os cremes mostraram-se eficazes na contração da ferida, ressaltando-se a concentração 40 vezes inferior de KPFV. Em apenas oito dias de tratamento, diferenças significativas foram observadas nos grupos tratados com os cremes à base de extrato de KP e de KPFV. Após o 12º dia de tratamento houve cicatrização de praticamente 100% em ambos os grupos, evidenciando o potencial desenvolvimento de um produto de origem vegetal útil na cicatrização de feridas (COUTINHO, 2013).

Sob o prisma de utilização de uma planta como fitoterápico para uso humano e animal, deve-se sempre considerar a toxicidade dos compostos obtidos da espécie para maior segurança na terapêutica. O extrato da espécie *Kalanchoe brasiliensis* foi avaliada toxicologicamente em camundongos, nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg (*p.o.*), tendo demonstrado baixa toxicidade mesmo quando administrado durante 30 dias, não havendo alteração de peso corpóreo dos animais, do consumo de água ou ração, de sinais clínicos compatíveis com toxicidade, e nem mesmo morte (FONSECA, 2014).

Por sua vez, a toxicidade do extrato de *K. pinnata* foi avaliada pela equipe coordenada pela Profª Sônia Soares Costa (colaboradora em nosso projeto; NPPN/UFRJ) e pela Profª Bartira Rossi-Bergmann (IBCCF-UFRJ). Neste estudo, o tratamento com o extrato aquoso das folhas de KP foi instituído por via oral em camundongos saudáveis, bem como em um caso humano de leishmaniose cutânea. Os tratamentos diferiram em relação à duração e frequência, sendo de 30 dias (uma vez ao dia) para o grupo de camundongos, e de 14 dias (duas vezes ao dia) para o paciente humano. Utilizando-se as doses supra-terapêuticas de 163 e 215 mg/kg, respectivamente, não foi observada nenhuma reação adversa. Através da dosagem sérica de amostras coletadas ao fim do experimento, os níveis séricos de alanina-aminotransferase (ALT), de aspartato-aminotransferase (AST), de ureia e de fosfatase alcalina de ambas as espécies permaneceram inalterados, indicando ausência de toxicidade crônica ao fígado, ao coração e aos rins (TORRES-SANTOS *et al.*, 2003).

Posteriormente, outros autores buscaram determinar a toxicidade aguda através da DL<sub>50</sub> para o extrato aquoso das folhas de *K. pinnata*. Doses entre 0,1 até 8 g/kg foram administradas por via oral a camundongos, e nem mesmo as doses mais elevadas foram capazes de levar à morte estes animais. Desta forma, não foi possível determinar o valor de DL<sub>50</sub> para esse extrato (SOUSA *et al.*, 2005). A segurança do extrato de *K. pinnata* foi confirmada, ainda, em ensaio clínico realizado em 67 mulheres grávidas (25 a 35 semanas de gestação), onde não foi verificado qualquer sinal de toxicidade na mãe e no neonato (PLANGGER *et al.*, 2006).

Foi demonstrada também a segurança de metabólitos bioativos isolados de KP. Nenhum dos flavonoides testados apresentou citotoxicidade significativa no teste de liberação da enzima lactato-desidrogenase, uma enzima citoplasmática que é encontrada no sobrenadante quando ocorre lise celular (MUZITANO *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2012).

Visto que a *Kalanchoe pinnata* é utilizada para insônia e distúrbios emocionais durante o trabalho de parto (HOSOMI *et al.*, 2014) estudos recentes testaram a tintura mãe de KP em ratos Wistar e seus fetos durante a gestação. A administração diária deste composto não interferiu no desenvolvimento fetal nem da parturiente, demonstrando assim certa segurança no uso deste composto nestas condições clínicas (HOSOMI *et al.*, 2014).

Desta forma, os dados disponíveis até o momento na literatura não indicam toxicidade desta espécie vegetal nas condições em que foram obtidos, o que a torna ainda mais promissora para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

### 1.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um processo complexo que se inicia a partir de um trauma físico, químico ou microbiológico, sendo um fenômeno fisiológico importante para reparar e remover tecidos afetados por agentes potencialmente patogênicos (O'BYRNE; DALGLEISH, 2001; LAWRENCE *et al.*, 2002). Contudo, quando exacerbado e prolongado, esse processo pode levar a efeitos deletérios (GILMAN *et al.*, 2012).

O termo “inflamação” provém da palavra latina “*inflammatio*”, que significa colocar fogo, remetendo a um dos sinais cardinais da inflamação. Estes sinais foram definidos por Cornelius Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) na expressão: “*rubor et tumor cum calore et dolore*”, que significa “rubor e tumefação, acompanhados de calor e dor”. Em meados do século XIX a perda da função foi incluída pelo patologista alemão Rudolf Virchow (1821-1902) como o quinto sinal cardinal (KALISCH, 1975), embora o médico grego Claudio Galeno (129-216 d.C.) receba com frequência o mérito por este feito (RATHER, 1971).

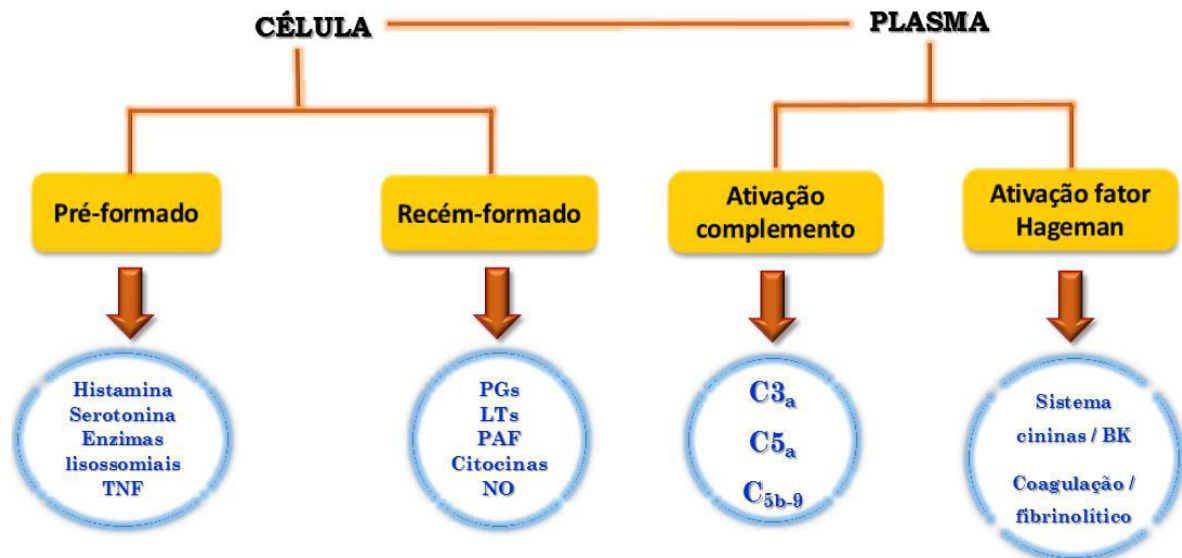
Os fenômenos que garantem os sinais cardinais da inflamação são compostos por alterações celulares e vasculares que ocorrem no tecido lesionado. Ocorre dilatação vascular, garantindo os sinais de rubor, ou hiperemia, e o calor, uma vez que há aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamatório. Com o fluxo aumentado, a coloração avermelhada das hemácias que se encontram dentro do vaso sanguíneo torna-se evidente no tecido afetado. Além disso, o aumento do influxo de sangue no local permite a troca de calor entre as partes internas do organismo e a periferia. O aumento do metabolismo local também determina o calor presente no sítio da inflamação. A alteração na permeabilidade capilar, com consequente aumento da exsudação de fluidos a partir dos vasos sanguíneos e proteínas para os tecidos adjacentes, resulta no edema, tumefação ou inchaço. Este aumento da permeabilidade permite ainda o acúmulo de células de defesa e formação de tecido de granulação em alguns casos. Por sua vez, a dor ocorre por um aumento de pressão nas terminações nervosas, mas principalmente pela liberação de mediadores sintetizados no processo inflamatório e em seu decorrer. É devido à dor e ao edema local que a movimentação do tecido afetado pode ser inibida e até mesmo abolida, podendo assim ocorrer perda da função tecidual (JONES *et al.*, 2000; MONTENEGRO; FECHIO, 2010).

#### 1.3.1 Fisiopatologia da inflamação

A inflamação pode ser dividida em três fases, que resultam de diferentes mecanismos: uma fase aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular; uma fase subcrônica, caracterizada por infiltração leucocitária e de células do sistema fagocitário mononuclear, sendo os neutrófilos o tipo celular mais envolvido, seguido dos monócitos que maturam até macrófagos e influenciam outros macrófagos residentes. Por fim, pode ocorrer uma fase crônica, onde geralmente desenvolve-se lesão tecidual permanente com substituição de células funcionais por células fibrosas e afuncionais (ROTELLI *et al.*, 2003; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

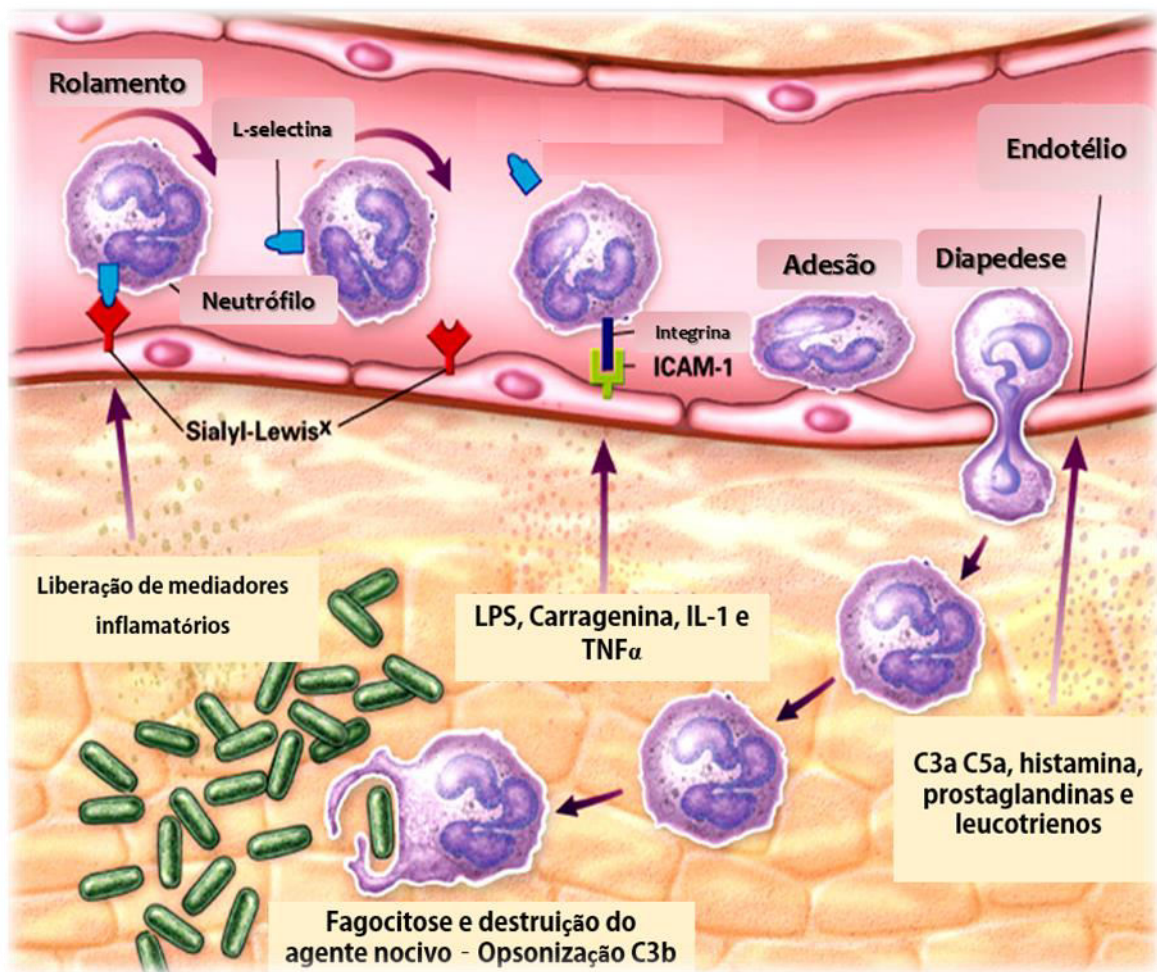
Portanto, o processo inflamatório tem origem a partir de eventos vasculares, sendo sua manutenção garantida por diversos mediadores inflamatórios sintetizados e liberados *in situ* (Figura 5). Mediadores como o óxido nítrico (NO), as prostaglandinas (PG), dentre elas as prostaciclina (PGI), são responsáveis por promoverem a vasodilatação, o aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade dos vasos (VERGNOLLE, 2008). A liberação simultânea de histamina, bradicinina, fator de agregação plaquetária (PAF) e leucotrienos (LT) promove ainda a dilatação de pequenas arteríolas, a qual pode ser seguida de redução do fluxo com eventual estase do sangue. Este fenômeno resulta em exsudação plasmática, uma vez que estes mediadores levam ao aumento da pressão oncótica vascular e da permeabilidade das

vênulas, permitindo o extravasamento de fluidos para o espaço extravascular (GILROY *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2007). Estes eventos garantem ainda a passagem de macromoléculas, como algumas proteínas, bem como a migração de células a partir do endotélio vascular até o tecido circundante, o que ocorre logo nas primeiras horas após o estímulo inflamatório e contribui para a formação do edema tecidual local (GILROY *et al.*, 2004).



**Figura 5.** Principais mediadores liberados por fatores celulares e plasmáticos durante o processo inflamatório (modificado de KUMAR *et al.*, 2010).

Em sequência, ocorrem os eventos celulares da inflamação, que têm a participação de células residentes normalmente nos tecidos, como as células endoteliais, os macrófagos teciduais e os mastócitos, bem como das plaquetas e dos leucócitos, que têm acesso a partir do sangue. O fenômeno de transmigração leucocitária (Figura 6) ocorre através de estímulos quimiotáticos, a partir dos quais os polimorfonucleares alcançam a área inflamada, realizando este processo através do endotélio vascular (RANG *et al.*, 2007; MEDZHITOV, 2008; ROBBINS; COTRAN, 2010). Este evento inicia-se com a marginalização endotelial dos leucócitos a partir do fluxo sanguíneo, os quais em seguida realizam o rolamento ao longo do endotélio ativado. A etapa de adesão é garantida por moléculas conhecidas como selectinas, permitindo a desaceleração dos leucócitos em relação ao fluxo vascular, com posterior migração destes para fora do vaso sanguíneo, em direção ao espaço extravascular (MARSHALL *et al.*, 2003). Este processo, denominado diapedese, é regulado pela ativação de diferentes famílias de moléculas de adesão, como as selectinas e as integrinas. Estas encontram-se no endotélio inflamado e são passíveis de interação com contraligantes correspondentes presentes nos neutrófilos, capturando-os para a margem endotelial e daí ao espaço extravascular. A atração dos neutrófilos em direção ao agente invasor é mediada por substâncias químicas denominadas quimiotaxinas (ou quimiocinas), as quais podem ser liberadas por micro-organismos ou produzidas localmente por células como os macrófagos, como é o caso da IL-8. A partir deste evento, os neutrófilos são então capazes de englobar, matar e digerir micro-organismos através de produtos tóxicos do oxigênio e de enzimas proteolíticas (RANG *et al.*, 2007).



**Figura 6.** Transmigração leucocitária (Adaptado de ROBBINS; COTRAN, 2010).

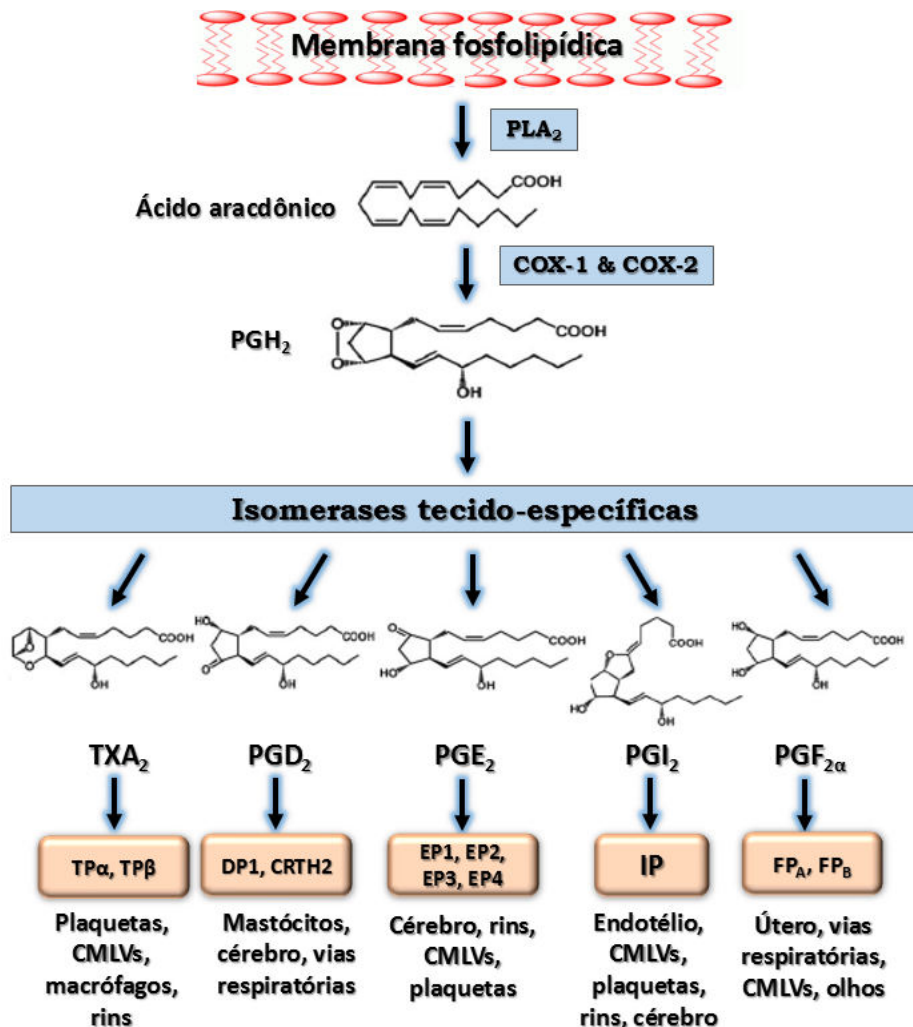
O desfecho usual do processo inflamatório agudo é a resolução com reparação do tecido lesado, restabelecendo a homeostase. Quando o estímulo nocivo persiste, mantendo-se assim a disfunção fisiológica, pode ocorrer o aparecimento de cicatrizes ou até mesmo a perda de função do tecido envolvido, constituindo-se uma situação de inflamação crônica (NATHAN 2002).

### 1.3.2 O ácido aracdônico e as prostaglandinas

A partir de um trauma tecidual de natureza mecânica/traumática, química, inflamatória ou mitogênica, é ativada a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que hidrolisa os fosfolipídios da membrana celular liberando o ácido aracdônico, que normalmente encontra-se estocado na membrana celular como éster glicérol (GILMAN *et al.*, 2012). Como consequência, ocorre o aumento na produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, tromboxano A<sub>2</sub> e leucotrienos. Deste ponto de vista, a inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> pode ser considerada uma atividade anti-inflamatória interessante do ponto de vista terapêutico (CARVALHO *et al.*, 1997; FITZGERALD, 2003).

O ácido aracdônico (AA) é um ácido graxo, composto de 20 carbonos, que pode ser convertido pela enzima cicloxigenase nos compostos intermediários PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> (prostaglandinas G<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> respectivamente) (KUMMER; COELHO, 2002; RICCIOTTI;

FITZGERALD, 2011) (Figura 7). Existem quatro principais subtipos de prostaglandinas bioativas:  $PGE_2$ ,  $PGI_2$ ,  $PGD_2$  E  $PGF_{2\alpha}$ . Todas são amplamente sintetizadas e agem como mediadores autócrinos e parácrinos a fim de manter a homeostase do organismo (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).



**Figura 7.** Cascata inflamatória e geração de prostanoídes a partir do ácido aracádônico (adaptado de RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). PLA<sub>2</sub> = fosfolipase A<sub>2</sub>; COX = cicloxigenase; PG = prostaglandina; TXA<sub>2</sub> = tromboxano A<sub>2</sub>; PGI<sub>2</sub> = prostaciclina I<sub>2</sub>; CMLVs = células de músculo liso vascular. Quadros em rosa contêm os tipos e subtipos de receptores para cada prostanoide.

As prostaglandinas são membros de uma grande família de compostos endógenos conhecidos como eicosanoides, derivados de ácidos graxos insaturados que apresentam 20 átomos de carbono (como o AA). Estas moléculas foram descobertas por dois ginecologistas americanos, Kurzok e Lieb, no início da década de 30, no sêmen humano. Em 1935, um pesquisador sueco, *von* Euler, observou que extratos de líquido seminal e de glândulas acessórias afetavam a pressão sanguínea e a função contrátil da musculatura lisa, Foram então denominadas prostaglandinas (PGs), provavelmente por terem níveis elevados em extratos de próstata (BERGSTROM *et al.*, 1959; SPINOSA *et al.*, 2011).

Ao contrário de muitos autacoides, as prostaglandinas não estão armazenadas em vesículas ou outros compartimentos orgânicos; sua presença no organismo depende



exclusivamente de sua síntese a partir de ácidos graxos disponíveis que, como os complexos fosfolipídicos, fazem parte de membranas celulares (SPINOSA *et al.*, 2011). A síntese de prostaglandinas durante a resposta inflamatória muda consideravelmente, aumentando-se os níveis e subtipos de prostaglandinas assim que se inicia o processo inflamatório, garantindo desta forma o recrutamento de leucócitos e o infiltrado de células imunes no local (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Pela existência de inúmeros receptores específicos e vários mecanismos reguladores, explica-se a variedade clínica de atuação das prostaglandinas: papel central na inflamação, na coagulação sanguínea, na ovulação, no parto, no metabolismo ósseo, no crescimento e desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002).

O papel das prostaglandinas  $E_2$ ,  $D_2$  e  $F_{2\alpha}$  como agentes pró-inflamatórios baseia-se principalmente no fenômeno da vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, levando ao aumento do fluxo sanguíneo com consequente formação de edema na área de lesão (PECCHI *et al.*, 2009). Embora sua capacidade de aumentar a permeabilidade capilar a proteínas plasmáticas por ação direta seja limitada, elas agem sinergicamente com outros mediadores, tais como a histamina e a bradicinina, que também aumentam a permeabilidade vascular. A  $PGI_2$  possui as ações das demais e ainda potencializa os efeitos quimiotáticos, facilitando o desempenho de outros mediadores no local da inflamação. De maneira semelhante, a  $PGE_2$  possui papel potencializador sobre as ações de mediadores que induzem a dor, incluindo a bradicinina e a histamina, os quais são liberados nos sítios inflamatórios promovendo a estimulação dos nociceptores. Cabe comentar ainda o papel da  $PGE_2$  nos processos febris, tornando a pele ainda mais sensível a estímulos dolorosos (LEES *et al.*, 2004; PECCHI *et al.*, 2009).

### 1.3.3 Citocinas e quimiocinas

As citocinas são moléculas proteicas de baixo peso molecular (6-70 kDa) sintetizadas por leucócitos e células estruturais, e estão envolvidas na diferenciação celular, na reparação tecidual, bem como na regulação dos mecanismos efetores das respostas imune e inflamatória (HANADA; YOSHIMURA, 2002; PECCHI *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010; STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015). Participam do monitoramento de diversas funções celulares, fazendo para isto uma comunicação célula-célula, tendo portanto amplo valor biológico e clínico (O'SHEA *et al.*, 2011). Uma mesma citocina pode ter várias ações em contextos biológicos diferentes, podendo atuar em sinergismo ou antagonismo com diversas outras citocinas (WHICHER; EVANS, 1990). Isto é possível pela sua capacidade de amplificar um determinado processo fisiológico, levando a respostas celulares mesmo com poucas moléculas efectoras (XUE *et al.*, 2015).

As citocinas podem ser classificadas de acordo com sua atividade biológica, sendo ditas como pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ .) ou anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4 e IL-10). Podem ainda ser divididas em subgrupos, como as interleucinas (ILs), fatores de crescimento, interferons, fatores estimuladores de colônia e quimiocinas (WONG; FISH, 2003; WOJDASIEWICZ *et al.*, 2014). As quimiocinas são consideradas citocinas de um grupo particular, as quais possuem propriedades químicas e funcionais específicas, sendo de extrema importância nos processos de quimiotaxia, estimulando o movimento leucocitário e a quimiotaxia (KUMAR *et al.*, 2010).

Algumas das primeiras citocinas envolvidas e descritas no processo inflamatório foram: IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e as quimiocinas IL-8, quimiocina quimioatraente de neutrófilos 1 (CINC-1) e quimiocina derivada dos queratinócitos (KC) (VERRI JR *et al.*, 2006). A IL-1 $\beta$  é

produzida principalmente por macrófagos, linfócitos e células da glia; está envolvida em muitas características do processo inflamatório, sendo responsável pela produção de outros mediadores deste processo. Esta citocina estimula o recrutamento de células da série branca sanguínea, auxilia na produção de febre (pirógeno endógeno), na liberação de proteínas de fase aguda e no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO *et al.*, 1984; DINARELLO, 1998).

A partir de um trauma tissular são liberadas uma série de citocinas, podendo-se destacar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que induz a liberação de outras citocinas como a interleucina 1-Beta (IL-1 $\beta$ ) e a interleucina 8 (IL-8). A IL-1 $\beta$  promove um aumento da expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), a qual é responsável pela produção de prostaglandinas e tromboxanos (TXs). Por sua vez, a IL-8 promove a produção local de aminas simpatomiméticas, histamina e serotonina. O acúmulo local destes e outros mediadores químicos, bem como alterações na temperatura, pH tecidual, concentração de eletrólitos como o K<sup>+</sup>, e a superexpressão (*upregulation*) de enzimas como ciclooxigenase, protease e fosfolipase (BASBAUM; JULIUS, 2006; DRIESSEN, 2007), induzem a sensibilização de receptores sensitivos primários (NSP) provocando sensação de dor.

### 1.3.3.1 TNF- $\alpha$

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ , ou somente TNF) é uma importante citocina pró-inflamatória envolvida com a resposta imune inata (CLARK, 2007), tendo sido identificado em 1975 como uma glicoproteína induzida por toxinas. Esta nomenclatura foi dada devido à sua característica de causar necrose hemorrágica em tumores, conforme observado em experimentos com ratos (CARSWELL *et al.*, 1975). O TNF- $\alpha$  humano foi clonado 10 anos mais tarde, já tendo sido identificado como regulador chave na resposta inflamatória (PENNICA *et al.*, 1985). Conforme relatado por diversos autores (COPE *et al.*, 1992; FELDMAN *et al.*, 1996; MORELAND *et al.*, 1999; KLINKHOFF, 2004), este papel no desenvolvimento da inflamação é alvo contínuo de estudos, os quais focaram inicialmente no controle do desenvolvimento da artrite reumatoide através do uso de anticorpos monoclonais anti-TNF (KLINKHOFF, 2004).

A síntese de TNF- $\alpha$  é realizada predominantemente por macrófagos e linfócitos T, gerando inicialmente uma proteína de 26kDa denominada pro-TNF que é expressa na membrana plasmática. A partir daí esta molécula fica passível de clivagem pelas metaloproteinsases da matriz extracelular, gerando a forma solúvel do TNF, com apenas 17kDa. A forma pro-TNF e sua forma solúvel são biologicamente ativas, podendo contudo apresentar atividades distintas no organismo (BRADLEY, 2008). Outros tipos celulares também sintetizam TNF- $\alpha$ , como mastócitos, graunulóticos, células *natural killer* (NK), fibroblastos, neurônios, queratinóticos e células musculares lisas (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2011).

Em condições basais, os níveis séricos de TNF- $\alpha$  são indetectáveis, porém em condições de infecção e/ou após um estímulo inflamatório esta citocina é produzida rapidamente e em grande quantidade, sendo mensurada em altas concentrações tanto no plasma quanto nos tecidos envolvidos (WAAGE *et al.*, 1987; ROBAK *et al.*, 1998). O estímulo inflamatório para a síntese de TNF- $\alpha$  pode ser iniciado por substâncias exógenas como o LPS e as  $\beta$ -glicanas, bem como por mediadores endógenos como a IL-1 (EIGLER, 1997).

Independente do estímulo, é necessária a ação da enzima conversora de TNF, conhecida como TACE (TNF- $\alpha$  converting enzyme), que medeia a liberação de TNF a partir da superfície celular (BLACK *et al.*, 1997). Por outro lado, esta enzima também possui papel sobre a expressão de receptores para TNF na membrana celular, a qual pode ser inibida pela

TACE e neutralizar assim as ações do TNF (WANG *et al.*, 2003). Além disto, a expressão de TNF- $\alpha$  também é dependente da ativação do fator de transcrição NF $\kappa$ B (EIGLER *et al.*, 1997). O NF $\kappa$ B é um fator de transcrição que possui um papel crítico na expressão de mediadores inflamatórios. Está sequestrado no citosol formando um complexo com seu inibidor I $\kappa$  $\beta$ . O NF $\kappa$ B apresenta uma gama de ação maior quando comparado a outros fatores de transcrição já caracterizados, e isto ocorre devido à grande variedade de estímulos que o ativam, bem como a inúmeros genes e fenômenos que ele regula. Entre esses estímulos estão os neurotransmissores (como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a  $\beta$ -amilóide), citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ), glicocorticoides, ésteres do forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, radiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a iNOS e a COX-2 (FORMAN; TORRES, 2002).

Essa citocina interage com a célula alvo através de uma ligação de alta afinidade com os receptores TNFR1 (receptor de TNF, tipo 1) e TNFR2 (receptor de TNF, tipo 2), sendo estes receptores expressos por todos os tipos celulares nucleados (CHOI *et al.*, 2005). O TNFR1 é expresso de forma constitutiva na maioria dos tipos celulares, enquanto que o TNFR2 tem sua expressão induzida por fatores como o próprio TNF- $\alpha$ , IL-1, e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), como demonstrado em astrócitos de ratos (CHOI *et al.*, 2005). A ligação do mediador ao TNFR1 garante principalmente a migração de neutrófilos, o choque induzido por endotoxinas e a dor neuropática após lesão do nervo. Por outro lado, a ligação ao TNFR2 influencia a apoptose celular e necrose (VERRI JR *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a expressão de TNFR2 é restrita a células hematopoiéticas, sendo interessante para a diferenciação dos tipos humanos e murinos de TNF- $\alpha$  (TARTAGLIA *et al.*, 1991).

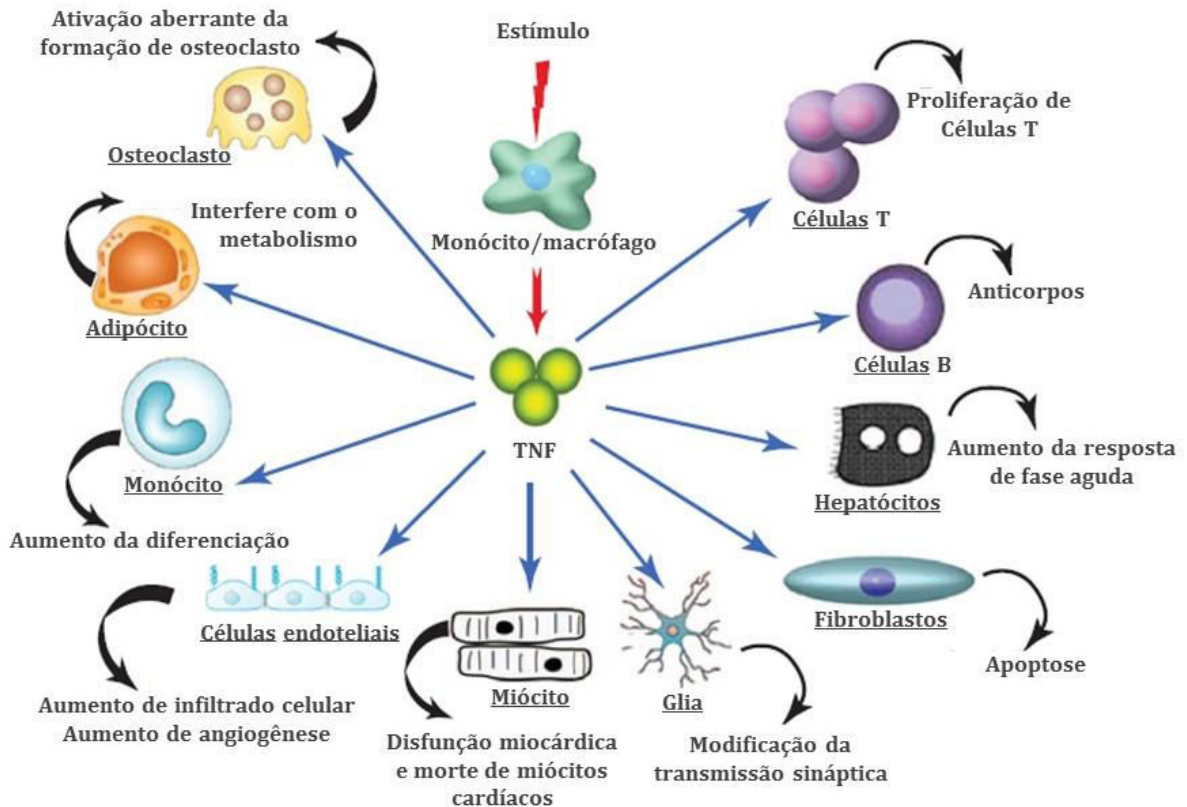
O TNF- $\alpha$  induz hipernociceção em ratos através de duas vias, independentes e paralelas, uma envolvendo o estímulo à produção de IL-1 $\beta$ , com consequente liberação de prostanoídes e a outra através ativação da quimiocina CINC-1 (quimiocina de ratos, análoga à IL-8 em humanos), com consequente liberação de aminas simpatomiméticas. Desta forma, os prostanoídes e as aminas simpatomiméticas são os mediadores finais da hipernociceção inflamatória (VERRI JR *et al.*, 2006).

Dentre as alterações promovidas pelo TNF- $\alpha$  podemos ainda citar diversas mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais, incluindo a produção de outras citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a liberação de substâncias pró-coagulantes e a indução de iNOS. Essas alterações podem levar, dentre outros fatores, ao choque séptico. Além disto, o TNF- $\alpha$  estimula linfócitos T e B, induz a febre, estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda e ainda suprime a lipase lipoprotéica, contribuindo assim para a caquexia (EIGLER *et al.*, 1997; SOARES *et al.*, 2008; MOHAMMADPPOUR *et al.*, 2015).

Sabe-se contudo, que o TNF- $\alpha$  possui um papel fisiológico ambíguo, atuando como agente pro-inflamatório e imunomodulatório, sendo esta segunda característica observada através de influência sobre as células T regulatórias (WU *et al.*, 2002). É portanto uma citocina multifuncional (Figura 8), com papel central na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO *et al.*, 2003). Exerce ainda papel essencial na rede de citocinas, especialmente com relação à patogênese de muitas doenças infecciosas e inflamatórias (EIGLER *et al.*, 1997; BRADLEY *et al.*, 2008; ESPOSITO; CUZZOCREA, 2011).

No que diz respeito ao processo inflamatório, várias características clássicas deste processo podem ser mediadas pelos efeitos locais do TNF nas células endoteliais, agindo como uma proteína de fase aguda e aumentando a permeabilidade vascular, além de recrutar macrófagos e neutrófilos para o sítio inflamatório (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2009). O TNF- $\alpha$  induz a expressão de COX-2 e LOX, podendo aumentar a síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, a prostaciclina e de produtos da LOX, como os leucotrienos, respectivamente, mediadores importantes na geração e manutenção dos sinais cardinais de

rubor e calor, uma vez que o fluxo vascular local é aumentado (MARK *et al.*, 2001). O edema também é resultado do aumento da permeabilidade vascular induzida pelo TNF- $\alpha$ , permitindo a transmigração de fluido e macromoléculas para o meio extravascular (BEVILACQUA *et al.*, 1986).



**Figura 8.** Alvos celulares do TNF- $\alpha$  (adaptado de ESPOSITO; CUZZOCREA, 2011).

Devido à sua múltipla ação em diversos sistemas do organismo e tipos celulares distintos, entende-se que o TNF- $\alpha$  possui tanto efeitos benéficos quanto maléficos, sendo responsável, por exemplo, pela destruição de células tumorais exercida pelos macrófagos e, em sinergismo com o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), tem alto poder de destruição de tumores susceptíveis (ROITT *et al.*, 1999). Pelo mesmo motivo, pode-se compreender a razão pelo qual as terapias envolvendo a inibição/modulação das ações do TNF- $\alpha$  ainda serem tão complexas (KODAMA *et al.*, 2005).

Diversos estudos têm descrito o papel da citocina TNF- $\alpha$  no desenvolvimento de algumas doenças importantes (DINARELLO *et al.*, 1993; TRACEY; CERAMI, 1994; GIBSON, 2004; METHE *et al.*, 2004; SCHACHNA, 2004, BRADLEY, 2008). Em diversas doenças inflamatórias e infecciosas foram identificadas altas concentrações plasmáticas de TNF- $\alpha$ , como por exemplo na sepse, meningite bacteriana, malária cerebral, síndrome da angústia respiratória do adulto, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), na artrite reumatóide (FELDMAN *et al.*, 1996; EIGLER *et al.*, 1997), na espondilite anquilosante, doença de Crohn e ainda em desordens neurológicas como a isquemia, doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (MONTGOMERY; BOWERS, 2012).

### 1.3.4 Mieloperoxidase (MPO)

Os leucócitos polimorfonucleares (LPMN), principalmente os neutrófilos, são as primeiras células a serem ativadas pelo sistema imunológico inato contra infecções. Estas células migram por quimiotaxia até o local da infecção, onde os micro-organismos invasores são destruídos através da fagocitose com posterior liberação, no fagolisossomo, de enzimas hidrolíticas, proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas enzimas hidrolíticas, bem como proteínas bactericidas, estão estocadas nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos, sendo liberadas a partir da fusão destes grânulos com os fagossomos. O conteúdo destes grânulos pode ser também liberado no meio extracelular, após a ativação dos neutrófilos (BABIOR, 1984; ARNHOLD, 2004).

Os neutrófilos apresentam quatro tipos de grânulos, que contêm diferentes enzimas e proteínas, destacando-se os grânulos azurófilos, os quais apresentam níveis elevados de mieloperoxidase (MPO). As peroxidases são enzimas que normalmente catalisam reações de oxidação envolvendo peróxido de hidrogênio, as quais são encontradas tanto em animais como em vegetais. Juntamente com a NADPH oxidase de membrana dos neutrófilos, as peroxidases estão envolvidas na geração de ERO (ARNHOLD, 2004).

A MPO é uma heme proteína presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, (representando 5% de seu peso seco) e também em monócitos (SCHULTZ; KAMINKER, 1962; LANZA, 1998), sendo secretada no meio extracelular e fagolisossomal e envolvida no sistema enzimático microbicida destas células (ZUURBIER *et al.*, 1992). Portanto, a partir dos neutrófilos, esta enzima atua na defesa do hospedeiro contra microorganismos patogênicos (SCHULTZ; KAMINKER, 1962; NAUSEEF, 2014). A ativação dos neutrófilos induz o metabolismo oxidativo caracterizado por um intenso consumo de oxigênio e produção de substâncias reativas como o ânion hipoclorito ( $\text{OCl}^-$ ). Dentre estas fontes geradoras do  $\text{OCl}^-$ , encontra-se o sistema  $\text{H}_2\text{O}_2$ -MPO, no qual a enzima mieloperoxidase reage com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela ação da NADPH oxidase, culminando na formação da espécie reativa  $\text{OCl}^-$ . O hipoclorito é considerado um potente agente microbicida que possui papel importante na defesa do hospedeiro contra invasão de bactérias, fungos e vírus (NEVE *et al.*, 2001; BUT *et al.*, 2002). Contudo, sob certas circunstâncias a liberação excessiva dessas espécies oxidantes pode promover estresse oxidativo e lesão tecidual (GAUT *et al.*, 2001).

O papel da MPO como uma promotora de danos tissulares por meio da produção de ácido hipocloroso está bem documentado (NAUSEEF, 2014). Este poderoso oxidante reage com duplas ligações de lipídios ocasionando uma peroxidação lipídica, o que leva ao aumento da permeabilidade de membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SGARBI *et al.*, 2006). A MPO também catalisa o consumo de óxido nítrico derivado no endotélio, reduzindo sua biodisponibilidade e prejudicando suas funções vasodilatadoras e anti-inflamatórias (ABU-SOUD; HAZEN, 2000).

Portanto a liberação de MPO a partir de células inflamatórias, ou seja, neutrófilos ativados é um parâmetro que pode ser utilizado para avaliar o grau de inflamação (ROSEN; MICHEL, 1997; NAUSEEF, 2014), servindo como um marcador do conteúdo neutrofílico do tecido avaliado (BRADLEY *et al.*, 1982).

### 1.3.5 Cicloxigenase (COX)

A enzima cicloxigenase (COX), também conhecida como prostaglandina sintase, é responsável pela síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracônico, sendo a  $\text{PGH}_2$  o principal precursor de todos os prostanóides sintetizados neste ciclo (ROBERTS *et al.*, 1980; BOTTING, 2006; KVATERNICK *et al.*, 2007). Além da  $\text{PGH}_2$ , a  $\text{PGG}_2$  é também um

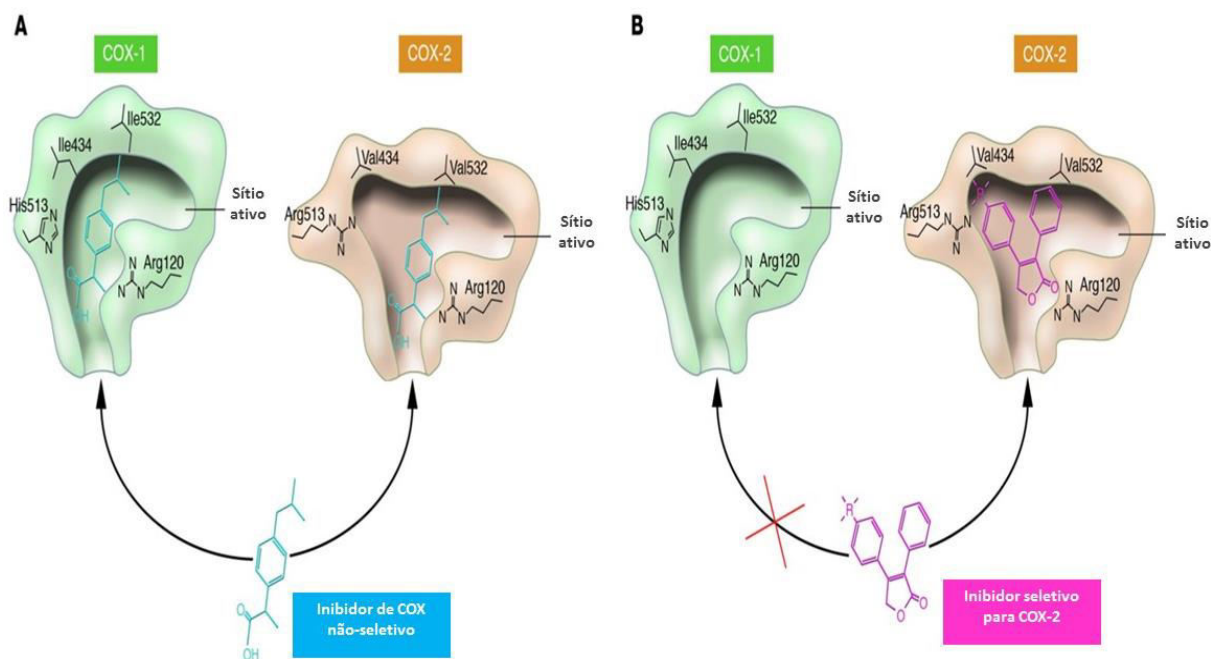
composto intermediário e quimicamente instável, sendo ambas convertidas por isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides, como PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>, entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de converter PGH<sub>2</sub> em apenas alguns desses produtos finais, dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido (HILÁRIO *et al.*, 2006; FILHO; RAHAL, 2008; KING *et al.*, 2009).

O conhecimento do ciclo destas enzimas é de extrema importância, uma vez que as prostaglandinas geradas ao final do processo possuem uma diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, atuando no papel central na inflamação, coagulação sanguínea, angiogênese, proteção da mucosa gástrica, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e no desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002; KVATERNICK *et al.*, 2007).

Sabe-se que existem duas isoformas homólogas da COX, sendo referidas como COX-1 e COX-2 (ROBERTS *et al.*, 1980; SMITH *et al.*, 2000; JONES, 2001). Uma terceira isoforma conhecida como COX-3 também já foi descrita (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002), sendo esta sintetizada a partir de uma via alternativa à da formação da COX-1, com sua atividade correspondendo a menos de 80% à atividade da COX-1. Alguns estudos indicam que esta isoforma não produziria prostanóides pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias (WILLOUGHBY *et al.*, 2000).

O perfil da síntese de prostanoides é influenciado pelo subtipo de cicloxigenase envolvido no processo. Além disto, os tipos celulares presentes no sítio inflamatório também são fatores importantes para este perfil, isto é, se existe uma população maior de mastócitos no tecido, a síntese predominante será de PGD<sub>2</sub>, enquanto que os macrófagos tendem a produzir mais PGE<sub>2</sub>. Quando a PGE<sub>2</sub> encontra-se em excesso, a síntese pelos macrófagos direciona-se para TXA<sub>2</sub> (TILLEY *et al.*, 2001).

Tanto a COX-1 como a COX-2 desempenham diversas funções fisiológicas, sendo bastante semelhantes estruturalmente: ambas possuem 72 kDa, sendo a COX-1 composta de 17 aminoácidos em sua cadeia peptídica amino-terminal, e a COX-2 de 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal (GIERSE *et al.*, 1996; KVATERNICK *et al.*, 2007). Embora a codificação genética garanta 60% de homologia entre elas, estas enzimas tem origens distintas, tendo o cromossomo 9 como responsável pela codificação de COX-1 e o cromossomo 1 pela codificação da COX-2 (GIERSE *et al.*, 1996). Devido à diferença na composição de um único aminoácido (isoleucina por valina) na estrutura destas enzimas, o sítio catalítico (ativo) da COX-2 torna-se maior, permitindo uma maior acessibilidade de drogas ao seu receptor (MURRAY *et al.*, 1986; KVATERNICK *et al.*, 2007; RANG *et al.*, 2007) (Figura 8b). É no sítio catalítico que ocorre a conversão do AA em PGH<sub>2</sub>, através de duas reações sequenciais: primeiro ocorre a cicloxigenação do ácido aracdônico em PGG<sub>2</sub>, e em seguida a PGG<sub>2</sub> é reduzida a PGH<sub>2</sub>. A diferença na estrutura tridimensional (Figura 9a) destas enzimas levou ao desenvolvimento de fármacos inibidores específicos para a COX-2 (Figura 9b).



**Figura 9.** Esquema dos sítios de ligação das cicloxigenases 1 e 2. Nota-se a diferença nos sítios de ligação de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) nas duas isoformas (A), com a presença de um “bolso lateral” na COX-2 (à esquerda na estrutura) que torna seu sítio catalítico maior e permite a interação com estruturas de grupamentos químicos mais volumosas (B) (adaptado de GROSSER *et al.*, 2006).

A enzima COX-1 é expressa constitutivamente em quase todos os tecidos e tipos celulares sadios (DUBOIS *et al.*, 1998), com exceção do eritrócito, promovendo a síntese das PGs, principalmente as relacionadas com ações fisiológicas como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal (FUNK; FITZGERALD, 2007). No trato gastrointestinal está associada à produção de muco protetor e inibição da secreção ácida gástrica, e nas plaquetas leva à síntese do tromboxano A<sub>2</sub>, um mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária. É portanto uma enzima mantenedora da homeostase, sendo denominada de COX constitutiva. Assim, fármacos que inibem essa isoforma podem levar a diversos distúrbios no trato gastrointestinal, estando associadas ao risco de sangramento desta região como efeito adverso (KUMMER; COELHO, 2002; LEES *et al.*, 2004; BRICKS; SILVA, 2005; FRANCO *et al.*, 2006; HAZEWINKEL *et al.*, 2008; STEAGALL *et al.*, 2009).

Por outro lado, a enzima COX-2 encontra-se em níveis baixos e não detectáveis normalmente no organismo, sendo sintetizada por estímulos químicos e denominada de COX induzida. Estes estímulos provêm de processos como a inflamação, dor, febre e câncer (KUMMER; COELHO, 2002; FRANCO *et al.*, 2006; HAZEWINKEL *et al.*, 2008), os quais têm a participação de citocinas como a IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$ , fatores de crescimento, endotoxinas e estimulantes tumorais (FITZGERALD; PATRONO, 2001; HARRIS; BREYER, 2001).

A COX-2 também está relacionada às ações fisiológicas que mantêm a homeostase em tecidos como: útero, cartilagens, ossos, rins, ovário e endotélio vascular (KUMMER; COELHO, 2002; BRICKS; SILVA, 2005; HILÁRIO *et al.*, 2006; PAPICH, 2008; STEAGALL *et al.*, 2009). Também foi identificada no sistema nervoso central, sendo expressa de forma fisiológica no córtex, no hipocampo, no hipotálamo e no cordão espinhal. Esta isoforma auxilia no desenvolvimento das funções cerebrais normais da atividade

sináptica (neurotransmissão) e na consolidação da memória (VANE *et al.*, 1998; KUMMER; COELHO, 2002; SPINOSA *et al.*, 2011). Já no tecido renal ela está presente na mácula densa e nas células intersticiais da medula renal, responsabilizando-se pela manutenção dos níveis de reabsorção de sódio e de água, devido à liberação de renina da macula densa. No sistema vascular assegura a produção de prostaciclina, que produz efeitos vasodilatadores e que evitam a agregação plaquetária, mantendo taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal (MATHEWS *et al.*, 1990; KUMMER; COELHO, 2002; CLARK, 2006; SPINOSA *et al.*, 2011).

Embora a COX-2 pareça ser a principal fonte de prostaglandinas durante a inflamação, existem algumas hipóteses de que ambas as isoformas na espécie humana podem contribuir para o desenvolvimento da resposta inflamatória aguda (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Uma evidência disto é a indução da COX-1 – constitutiva em células inflamatórias residentes – durante a resposta inflamatória e a diferenciação celular induzidas por LPS (McADAM *et al.*, 2000).

Ambas as isoformas, COX 1 e 2, são alvos potenciais de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs). Estas drogas competem pelo sítio ativo das enzimas (YUAN *et al.*, 2009), onde podem se ligar e inativar apenas um dos monômeros da estrutura dimérica das ciclooxigenases. Esta única ligação é suficiente para interromper a síntese de prostanoídeos (YUAN *et al.*, 2009), uma vez que estes fármacos inibem a oxidação do ácido aracídico pelas COXs (VANE, 1971).

#### 1.4 Flavonoides

Em 1930, foi isolada uma substância inédita a partir de laranjas, acreditando-se inicialmente que fazia parte de uma nova classe de vitaminas e sendo denominada de vitamina P. Posteriormente, ficou claro que se tratava da rutina, o primeiro flavonoide descoberto e pertencente a então nova classe de compostos isolados de espécies vegetais (MIDDLETON, 1998). Os flavonoides consistem num grupo de compostos polifenólicos que se encontram amplamente distribuídos em plantas, vegetais, sucos de frutas e bebidas como chás, café e vinhos (SHAGHAGHI *et al.*, 2009). Por serem compostos fitoquímicos não podem ser sintetizados por humanos e animais, tornando-se parte da dieta através da ingestão destes alimentos (KOES *et al.*, 2005). Nos alimentos, os flavonoides geralmente são responsáveis pela coloração, sabor, prevenção da oxidação de gorduras e proteção de vitaminas e enzimas (YAO *et al.*, 2004).

Nas plantas os flavonoides são encontrados em diferentes partes, como nas sementes, cascas de árvores, raízes, talos e flores, bem como em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT *et al.*, 2001). São metabólitos secundários provenientes de respostas defensivas contra microorganismos (DIXON *et al.*, 1983) e contra insetos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Fatores abióticos, como condições climáticas adversas e luz ultravioleta B (UV-B) por exemplo, também são combatidas por estes agentes uma vez que agem como filtros que protegem os tecidos fotossintetizantes (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; AGATI *et al.*, 2012). Os flavonoides são responsáveis por diversas atividades farmacológicas (MAHOMOODALLY *et al.*, 2005; PANDEY *et al.*, 2007), sendo estas diretamente relacionadas com sua estrutura molecular (KELLY *et al.*, 2002). Como exemplo, podemos citar a atividade antioxidante e anticancerígena, as quais são determinadas pela presença de grupamentos hidroxila em diversas posições, bem como de duplas ligações nas posições C2 e C3 (BAE *et al.*, 2012). A atividade antioxidante já foi demonstrada em sistemas *in vitro* e *in vivo* (COOK; SAMMAN, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1995), e continua



sendo constante alvo de estudo. A atividade anticancerígena provém da habilidade dos flavonoides em regular a progressão do ciclo celular (RAMESOVÁ *et al.*, 2012).

Algumas plantas medicinais são ricas em compostos flavonoides, sendo compreensível portanto os benefícios encontrados com o uso de muitas espécies vegetais pela população ao longo dos tempos. Mais de 4000 diferentes flavonoides já foram descritos (HOLLMAN; BATAN, 1997; MIDDLETON, 1998), sendo classificados como: flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides (FORMICA; REGELSON, 1995). Seus efeitos provêm da habilidade dos flavonoides em induzir os sistemas enzimáticos de proteção do organismo, com isto, uma ampla diversidade de efeitos biológicos pode ser atribuída a estes compostos, como a atividade antioxidante, proteção vascular, proteção hepática, atividade antialérgica, antiproliferativa, antiosteoporose, anti-inflamatória (RAMESOVÁ *et al.*, 2012), antimicrobiana, além de efeitos protetores em doenças degenerativas e cardiovasculares (RICE-EVANS *et al.*, 1995; COOK; SAMMAN, 1996; PANDEY *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2013). As isoflavonas, as flavanas e as flavonas são conhecidas por possuírem atividade antifúngica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Além destas, existem ainda relatos de atividade antiulcerogênica, mutagênica, hipolipidêmica e antiplaquetária (FORMICA; REGELSON, 1995).

Em estudo de Costa e colaboradores (2012), foi demonstrado o uso dos flavonoides presentes em diversas formulações farmacêuticas patenteadas com objetivos profiláticos e terapêuticos contra o vírus da influenza. A atividade dos flavonoides sobre este agente patogênico ocorre através de suas propriedades anti-inflamatórias e antivirais, sendo moléculas promissoras no arsenal terapêutico contra a gripe (COSTA *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação, inibindo a proliferação de linfócitos T, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa - TNF- $\alpha$  e a interleucina 1 - IL-1, estimulando a síntese de IFN (HAVSTEEN, 2002), modulando a atividade das enzimas da via do ácido aracdônico, tais como fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (KOES *et al.*, 2005; MIDDLETON *et al.*, 2000; HAVSTEEN, 2002; KIM *et al.*, 2004; BIESALSKI, 2007; CAZAROLLI *et al.*, 2008; LÓPEZ-POSADAS *et al.*, 2008; PAL *et al.*, 2009). Modulam ainda a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MARCHAND, 2002), enzima importante envolvida com a atividade antioxidante (MILLER, 1996). Estes compostos inibem também a proteína tirosina quinase C (PKC) (MIDDLETON *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2009), bem como a degranulação de neutrófilos (MIDDLETON *et al.*, 2000). Alguns exemplos de flavonoides com atividade anti-inflamatória são a apigenina, a luteolina e a quercetina. A hesperidina, além de atividade anti-inflamatória, possui também propriedades analgésicas (TAPAS *et al.*, 2008). Em casos inflamatórios crônicos, a rutina já foi descrita como altamente efetiva em modular estes processos (GUARDIA *et al.*, 2001). Ações diretas sobre a inibição das enzimas COX e LOX já foram atribuídas ao kaempferol, a quercetina, a miricetina e a fisetina (TAPAS *et al.*, 2008).

Ensaio farmacológico *in vitro*, utilizando culturas de células por exemplo, podem ser realizados na triagem da ação anti-inflamatória de compostos flavonoides, objetivando verificar se o flavonoide é capaz de reduzir ou até mesmo inibir a formação de mediadores pró-inflamatórios, a produção de enzimas e citocinas, bem como a proliferação de linfócitos. Na regulação da síntese de prostaglandinas, a ciclooxigenase é uma enzima que representa um ponto crítico de controle (NARABA *et al.*, 1998), sendo o principal alvo de ação das drogas anti-inflamatórias não esteroidais. Alguns flavonoides, como a quercetina, bloqueiam ambas as vias da ciclooxigenase e lipoxigenase em concentrações relativamente altas, enquanto que em baixas concentrações a via da lipoxigenase torna-se alvo primário (LANDOLFI *et al.*, 1984). Além disto, vários estudos demonstram a atividade antioxidante exercida pelos

flavonoides, principalmente a capacidade de sequestrar espécies oxidantes como ânion superóxido, radical hidroxila e radical peroxila (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os ensaios *in vivo* utilizam agentes indutores de inflamação em animais de laboratório como, por exemplo, a carragenina, visando avaliar se o flavonoide é capaz de reduzir ou até mesmo de inibir a formação do edema, a migração das células de defesa, a formação de mediadores e enzimas (COUTINHO *et al.*, 2009). Outros modelos de inflamação *in vivo* em ratos evidenciaram significativa atividade anti-inflamatória nas fases proliferativa e exsudativa da inflamação (HANDA *et al.*, 1992), como por exemplo na demonstração da inibição do edema de pata e do edema provocado pelo óleo de cróton no estudo de Di Carlo e colaboradores (1999). Em 2001, Guardia e colaboradores observaram que, após a indução experimental da artrite em ratos, flavonoides como a quercitina, rutina e hesperidina possuem habilidade em inibir a inflamação aguda crônica que ocorre nesta condição patológica (TAPAS *et al.*, 2008).

Uma vez que se utilizam ensaios *in vivo* como parte da investigação das propriedades farmacológicas dos flavonoides, é importante considerar o potencial de toxicidade destes compostos. Vale lembrar que os flavonoides são amplamente distribuídos em plantas comestíveis, sendo por isto muitas vezes considerados como não tóxicos (COOK; SAMMAN, 1996; CUSHNIE; LAMB, 2005). Esta premissa em parte pode ser considerada válida, uma vez que a solubilidade das agliconas em água é baixa, permitindo assim um curto tempo dos flavonoides no intestino. Além disto, o baixo coeficiente de absorção destes compostos os torna seguros em relação a toxicidade para humanos (HAVSTEEN, 2002), excetuando-se os raros casos de alergia (SPENCER *et al.*, 2009). Contudo, devido a ampla variedade de atividades biológicas em potencial dos flavonoides sobre as células de mamíferos, a confirmação de possíveis efeitos adversos é sempre necessária antes da liberação do uso destas substâncias para uso medicinal (CUSHNIE; LAMB, 2005).

## 1.5 DOR

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como percepção de uma sensação nociceptiva desagradável (IASP, 2011), sendo parte integrante da vida. Está presente ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, desde o nascimento até a morte (TURK; MELZACK, 1992; WILLIAMS *et al.*, 1993), sendo considerada um problema de saúde global que afeta 20% de toda a população mundial de maneira aguda ou crônica, sendo este último caso representado pelo diagnóstico de 10% da população adulta (GUREJE *et al.*, 1998; BOND, 2011; GOLDBERG; MCGEE, 2011; REARDON *et al.*, 2015). As principais causas de processos dolorosos são: câncer, artrite reumatoide, cirurgias, traumas físicos e problemas espinhais. Pela complexidade de sua etiologia, a dor pode induzir uma séria de sequelas, incluindo a inabilidade para trabalhar, as alterações no convívio social, a depressão e até pensamentos suicidas (BOND, 2011; GOLDBERG; MCGEE, 2011; REARDON *et al.*, 2015). Por este motivo, representa um alto custo social devido aos gastos com a saúde pública, uma vez que pode levar à incapacidade permanente de milhões de pessoas (VERRI JR *et al.*, 2006).

A dor depende da percepção consciente da ativação do sistema sensorial nociceptivo, existindo um relativo consenso de que, ao nascer, o sistema nociceptivo já está desenvolvido (LOWERY *et al.*, 2007). Este sistema evoluiu ao longo do tempo a fim de detectar e reagir a um estímulo externo, de maneira a ampliar e facilitar a condução nervosa com o objetivo de evitar situações desagradáveis, manter as funções fisiológicas e preservar a vida (WALTERS, 1994; WOOLF; MANNION, 1999; BASBAUM *et al.*, 2010). De acordo com a complexidade genética característica de cada espécie, as proteínas transdutoras possibilitaram diferenciar o

estímulo agressivo do inócuo (WALTERS *et al.*, 1994), como por exemplo a pressão exercida sobre determinado tecido. Esta diferenciação é possível através de nociceptores de alta frequência e baixo limiar de disparo, como os mecanorreceptores WDR (wide dynamic range; ou ampla faixa dinâmica), devido à rápida modulação e resposta à fatores químicos liberados no tecido lesado (WALTERS *et al.*, 1991).

Pode ser aguda ou crônica, e está relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias, havendo expectativa de desaparecimento após a cura da lesão. A dor aguda apresenta um início súbito e, geralmente, não dura muito. Quando a dor é intensa, pode causar aceleração do ritmo cardíaco, aumentar a frequência respiratória, elevar a pressão arterial, produzindo ainda sudorese e dilatação pupilar (BEERS; BERKOW, 2001). Respostas como ansiedade e a agitação psicomotora também são frequentes (CARVALHO *et al.*, 1999). A dor crônica dura semanas ou meses. Geralmente refere-se à dor que persiste por mais de um mês além da evolução habitual de uma doença ou lesão, a dor que retorna e desaparece ao longo de meses ou anos ou a dor associada a uma doença de longa evolução, como por exemplo, em casos de diabetes, artrite e câncer. Estas condições resultam de alterações nas propriedades de nervos periféricos e dos neurotransmissores envolvidos neste processo (BASBAUM *et al.*, 2010). Normalmente, a dor crônica não afeta o ritmo cardíaco, a frequência respiratória ou as pupilas (respostas neurovegetativas), mas pode alterar o sono (ansiedade), diminuir o apetite e causar constipação, perda de peso, diminuição da libido e depressão (BEERS; BERKOW, 2001).

Desde a publicação da teoria da comporta por Melzack e Wall em 1965 (MELZACK; WALL, 1965) tem-se o conceito de plasticidade neural, que diz respeito à capacidade do sistema nervoso de se adaptar e responder de acordo com diferentes condições ambientais. A hipersensibilidade é fundamental para a preservação da integridade do organismo, visto que é um sintoma que alerta para a ocorrência de lesões. Por outro lado, a dor crônica não tem esse valor biológico, sendo uma importante causa de incapacidade (CARVALHO *et al.*, 1999; BASBAUM *et al.*, 2010).

### **1.5.1 Fisiopatologia da dor**

A sequência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso inicia-se com a transformação dos estímulos ambientais, sejam eles térmicos, mecânicos ou químicos, em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central (CARVALHO *et al.*, 1999; BASBAUM *et al.*, 2010). Pode ser produzida inclusive por estímulos normalmente inócuos (KIDD; URBAN, 2006). Os receptores que respondem a estes diversos estímulos são definidos como nociceptores polimodais, sendo esta primeira etapa denominada transdução (KIDD; URBAN, 2001). Uma vez que os estímulos são transduzidos pelo terminal aferente primário, ocorre a ativação de uma variedade de canais iônicos voltagem dependentes, com os canais de sódio e de potássio dependentes de voltagem participando da geração de potenciais de ação que são transmitidos de terminais periféricos ao corno dorsal da medula (BASBAUM *et al.*, 2010). Esta etapa é conhecida como condução. A etapa final, denominada transmissão, compreende a transferência sináptica destes estímulos através de lâminas específicas no corno dorsal da medula até o encéfalo (KIDD; URBAN, 2001; BASBAUM *et al.*, 2010).

Anatomicamente, os corpos celulares dos nociceptores estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigeminal, possuindo ramos periféricos e centrais que inervam seus órgãos-alvo e a medula espinhal, respectivamente. Os nociceptores são ativados quando a intensidade do estímulo atinge um limiar nocivo, sugerindo que estes receptores

possuam propriedades moleculares e biofísicas que os permite detectar seletivamente e responder a injúrias de maneira proporcional (BASBAUM *et al.*, 2010).

A sensibilização dos nociceptores é transmitida para o corno dorsal da medula espinhal através da despolarização das fibras levemente mielinizadas, denominadas A delta (A $\delta$ ), ou não mielinizadas, chamadas fibras C, que são a via neuronal aferente primária (BESSON, 1999). Ambas as fibras A $\delta$  e C são capazes de transduzir impulsos provenientes de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, em impulsos elétricos que são transmitidos ao sistema nervoso central após a sua sensibilização. Por serem mielinizadas, as fibras A $\delta$  permitem uma rápida transmissão de estímulos (cerca de 12 a 30 m/s) que perduram por um curto período (RANG *et al.*, 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM *et al.*, 2010), conforme observado e endossado em estudos preliminares de Perl (1968; 1992). Estes estímulos são de natureza térmica ou mecânica de alto limiar, sendo responsáveis pela dor pungente, localizada (DRIESSEN, 2007; FARQUHAR-SMITH, 2007). As fibras C, não mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (cerca de 0,5 a 2 m/s) por um período mais longo e são consideradas fibras polimodais, isto é, são responsivas tanto a estímulos térmicos e mecânicos de alto limiar quanto a estímulos químicos. Estão associadas com a dor prolongada, difusa, em queimação (DRIESSEN, 2007; FARQUHAR-SMITH, 2007; BASBAUM *et al.*, 2010).

Um terceiro tipo celular conhecido como fibras A $\beta$ , de diâmetro largo e rápida condução, responde somente a estímulos mecânicos inócuos, como o tato (BASBAUM *et al.*, 2010). Além destas fibras, tem sido dada grande atenção a um grupo de fibras C denominadas nociceptores silenciosos, que seriam “acordados” durante o processo inflamatório, passando a participar da condução da dor inflamatória (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; McMAHON; KOLTZENBURG, 1990; KLEGGETVEIT *et al.*, 2012; DJOUHRI *et al.*, 2015).

Esses sinais periféricos provocam a liberação de neurotransmissores de ação rápida, como ATP e glutamato, bem como neuropeptídeos de ação lenta, como SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neurotensina e neurocinina. Eles transmitem a informação periférica às fibras aferentes secundárias, que funcionam como transmissores (DRIESSEN, 2007).

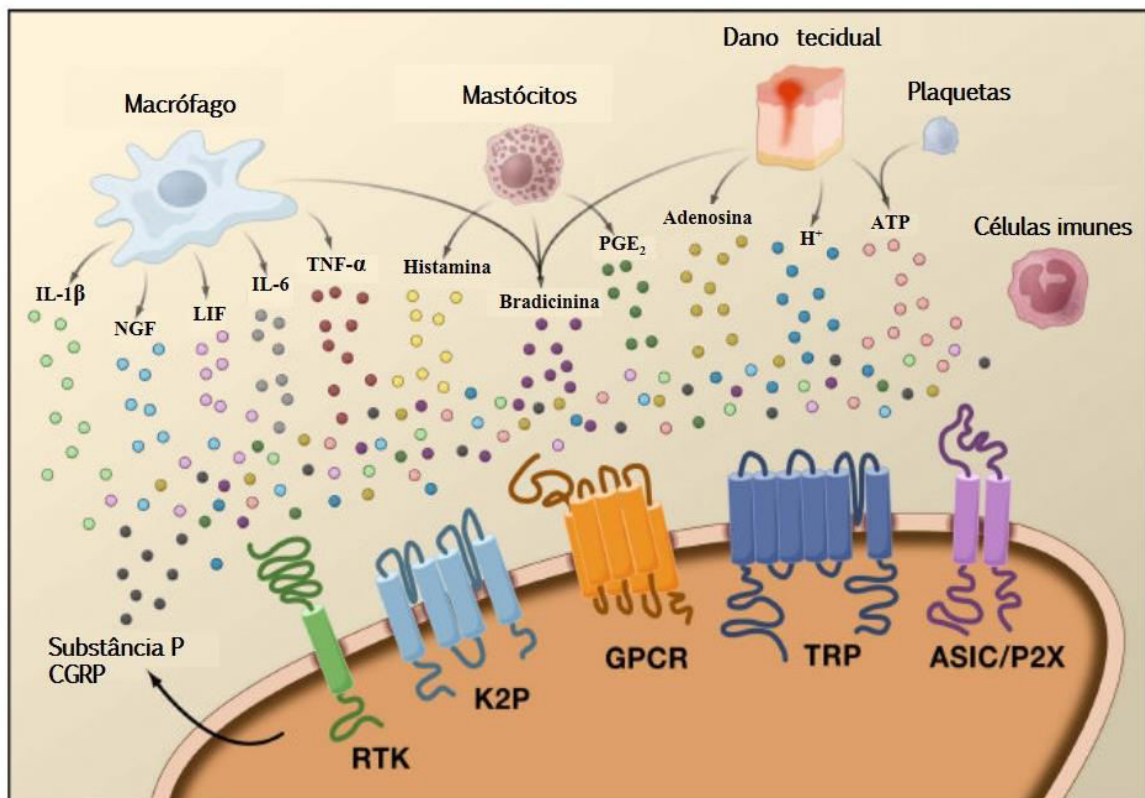
A comunicação com os neurônios secundários (ou de segunda origem) ocorre em regiões medulares conhecidas como lâminas de Rexed (REXED, 1952; WALL, 1967; DUBNER; BENNETT, 1983; BESSON; CHAOUCH, 1987; WILLIS; COGGESHALL, 1991). Estas lâminas diferem quanto à localização anatômica e parâmetros eletrofisiológicos (BASBAUM; JESSEL, 2000). Dependendo do tipo de neurônio (A $\delta$ , A $\beta$  ou C) há uma localização terminal diferenciada na medula espinhal. As fibras A $\delta$  tipicamente projetam-se para a lâmina I, bem como para regiões mais profundas do corno dorsal medular, como a lâmina V. As fibras aferentes A $\beta$ , de disparo lento, também se projetam para regiões profundas, correspondidas pelas lâminas III, IV e V. Por outro lado, as fibras C projetam-se para regiões mais superficiais, como as lâminas I e II (BASBAUM *et al.*, 2010).

A maioria dos neurônios associados à inflamação termina nas lâminas mais superficiais (camada I e II – substância gelatinosa). Curiosamente, os neurônios na lâmina V recebem estímulos nociceptivos e não nociceptivos por vias diretas (A $\delta$  e A $\beta$ ; monossinápticas) e por vias indiretas (fibras C; polissinápticas). As vias polissinápticas são também denominadas vias de ampla faixa dinâmica (WDR = wide dynamic range), e respondem a uma ampla gama de intensidades de estímulos (BASBAUM *et al.*, 2010).

As eferências a partir das lâminas I e V constituem a maioria das saídas do corno dorsal da medula para o encéfalo, ascendendo pelos trato espinotalâmico e espino-reticulo-talâmico (BASBAUM; JESSEL, 2000). Esses tratos transportam informações dolorosas ao tálamo e ao córtex sensorial, bem como formação reticular, sistema límbico e hipocampo, as quais estão relacionadas com experiências de memória, cognição e emoção, contribuindo para a percepção global da experiência dolorosa (FARQUHAR-SMITH, 2007).

A dor de origem inflamatória resulta da ativação dos nociceptores periféricos por meio da liberação de neuropeptídeos como o CGRP e a substância P. A substância P age via receptores de neurocinina (NK-1), localizados nos neurônios do corno dorsal da medula, gerando uma resposta pós-sináptica intensa e aumentando a atividade dos receptores NMDA (THOMPSON *et al.*, 1994), sendo estes receptores ionotrópicos ativados pelo neurotransmissor excitatório glutamato. Esta resposta inclui a liberação de mediadores inflamatórios (HARDY *et al.*, 1950) que irão induzir a vasodilatação e o extravasamento de proteínas plasmáticas (BASBAUM; JESSELL, 2000).

Diversos mediadores inflamatórios são liberados de macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativando assim os nociceptores (fibras nervosas tipos Aδ e C) (HARDY *et al.*, 1950; KRAYCHETE *et al.*, 2006) (Figura 10). Dentre esses, destacam-se a acetilcolina, a bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o fator de ativação plaquetário, os radicais ácidos (prótons), os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, o fator de crescimento nervoso (NGF) e aminas simpatomiméticas (WRIGHT, 1999; VERRI JR *et al.*, 2006). A bradicinina, a prostaglandina E<sub>2</sub>, o NGF e as interleucinas pró-inflamatórias parecem exercer papel fundamental na nocicepção periférica (CHUANG *et al.*, 2001).



**Figura 10.** Mediadores periféricos da inflamação. Os danos teciduais levam à liberação de mediadores inflamatórios pela ativação de nociceptores ou células não-neuronais residentes ou infiltradas na área afetada, como: mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos. As moléculas de sinalização incluem: serotonina, histamina, glutamato, ATP, adenosina, substância P, CGRP, bradicinina, eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, endocanabinoides, NGF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), proteases extracelulares e prótons. Estes fatores se ligam aos respectivos receptores na superfície celular dos nociceptores (adaptado de BASBAUM *et al.*, 2010).

Dessa forma, a dor periférica é iniciada pela endotelina, substância P, histamina e pela bradicinina, sendo ampliada pela ação das PGs, principalmente a PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub>, através de sua ligação a receptores nociceptivos. As prostaglandinas são mediadores considerados como

sensibilizadores (ENGLAND *et al.*, 1996), uma vez que sensibilizam os neurônios aferentes primários à ação da bradicinina e outros mediadores, participando em diversos pontos ao longo da via nociceptiva (NEUGEBAUER *et al.*, 1989; RUEFF; DRAY, 1993). A PGI<sub>2</sub> está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE<sub>2</sub> se relaciona com a hiperalgesia longa, que pode persistir por até 6 horas (TAIWO; LEVINE, 1989; SPINOSA *et al.*, 2011). O acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos como as aminas simpatomiméticas e a substância P (SP) atuam nos nociceptores sensitivos primários (NSP), induzindo a sua ativação (BASBAUM; JULIUS, 2006). Visto a importância das prostaglandinas no processo de hiperalgesia inflamatória e nocicepção, a inibição das enzimas cicloxigenases resulta em um efeito anti-hiperalgésico significativo (PAYNE, 2000).

Diversos estudos tem como foco as citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e a quimiocina IL-8 (WOOLF *et al.*, 1997; XU *et al.*, 1997; BRESNIHAN *et al.*, 1998; MANI *et al.*, 1998; MURPHY *et al.*, 1999). As citocinas podem agir diretamente nos nociceptores ou, em sua maioria, indiretamente, estimulando a liberação de agentes como as prostaglandinas (BANKS; KASTIN, 1987; SHEERAN; HALL, 1997). O TNF- $\alpha$  é considerado o protótipo da citocina pró-inflamatória, pois possui a capacidade de iniciar uma cascata de ativação de outras citocinas e de fatores tróficos (McDERMOTT, 2001). A IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  são capazes de suprarregular a expressão do NGF, da COX-2, da óxido nítrico sintase (NOS) e estimular o brotamento simpático no gânglio da raiz dorsal, alterando a plasticidade sináptica para o estado de facilitação de longo termo (WOOLF *et al.*, 1997). De maneira geral, a superprodução dos mediadores inflamatórios mencionados pode levar à efeitos tóxicos aos nociceptores, podendo resultar em morte celular progressiva (CUI *et al.*, 2012), fenômeno este de grande ocorrência em processos crônicos como a osteoartrite por exemplo (SUTHON *et al.*, 2009; RAHMATI *et al.*, 2016).

Podemos considerar, portanto, a hiperalgesia inflamatória como o resultado de modificações funcionais nos nociceptores através da ativação metabotrópica destes. Desta forma, mudanças metabólicas nestas células neuronais, com a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios, facilitam a sua ativação (HARDY *et al.*, 1950; WRIGHT, 1999). Além da participação de receptores metabotrópicos, já foi também descrito uma família de canais iônicos que são ativados seletivamente por prótons (WALDMANN *et al.*, 1997a). Estes canais pertencem ao grupo de receptores sensíveis a ácidos (ASIC), os quais respondem a substâncias com baixo pH, levando à formação de uma corrente de sódio constante (WALDMANN *et al.*, 1997b).

O estudo dos mecanismos de ação das plantas medicinais contribuem de maneira significativa para o conhecimento dos mecanismos fisiológicos relacionados à geração, transmissão, manutenção e controle da dor. Não obstante, a maioria das drogas utilizadas atualmente como analgésicos derivam ou foram sintetizadas a partir de plantas medicinais. Logo, a avaliação do uso dos produtos naturais nos processos dolorosos merece atenção e permanece sob constante investigação do ponto de vista da farmacocinética e farmacodinâmica, favorecendo assim o tratamento e controle da dor de maneira global.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Considerando que as propriedades biológicas das folhas de *Kalanchoe pinnata* tenham sido amplamente pesquisadas, contrapondo-se aos poucos estudos abordando as propriedades anti-inflamatórias das inflorescências desta espécie e, diante da informação que a forma de utilização na medicina popular envolve, em sua maioria, não só as folhas, mas também outras partes da planta como as flores, torna justificável a investigação científica química e farmacológica também dessa parte da KP, cujos resultados poderão melhor explicar alguns dos usos medicinais da espécie voltados para o tratamento de doenças que envolvem a dor e a inflamação..

Levando-se em conta ainda a existência de poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos com o extrato aquoso das inflorescências da *Kalanchoe pinnata* (EAFL), bem como os promissores resultados previamente obtidos pelo grupo, essa pesquisa investigou o extrato bruto das inflorescências de KP, as frações e o composto flavonoide majoritário isolado, bem como possíveis mecanismos de ação relacionados a estas atividades.

### Objetivo geral

O presente estudo buscou, através de estudo farmacológico biomonitorado, avaliar o potencial antinociceptivo, antiedematogênico e anti-inflamatório das inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (folha da fortuna), realizando ensaios *in vivo* e *ex vivo* utilizando camundongos, bem como investigando possíveis mecanismos de ação envolvidos com estas atividades através de ensaios *ex vivo* e *in vitro*.

### Objetivos específicos

- I. Proceder o estudo farmacológico biomonitorado de compostos presentes nas inflorescências de KP, em parceria com o grupo de fitoquímica da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Soares Costa do *Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos* (LPN-Bio) do *Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais* (NPPN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ);
- II. Investigar as propriedades antinociceptiva e antiedematogênica do EAFL em ensaios *in vivo*;
- III. Investigar as propriedades anti-inflamatórias do EAFL e de frações ativas provenientes deste extrato através de testes de atividades farmacológicas *in vivo*;
- IV. Investigar as propriedades supracitadas (II e III) para o flavonoide majoritário KPFV após seu isolamento a partir do EAFL, utilizando ensaios *in vivo*;
- V. Determinar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com as atividades farmacológicas, através de ensaios *ex vivo* e *in vitro*;
- VI. Obter informações farmacológicas que possam levar à prospecção e a obtenção de novas moléculas bioativas que apresentem propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, produzindo efeitos adversos mínimos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

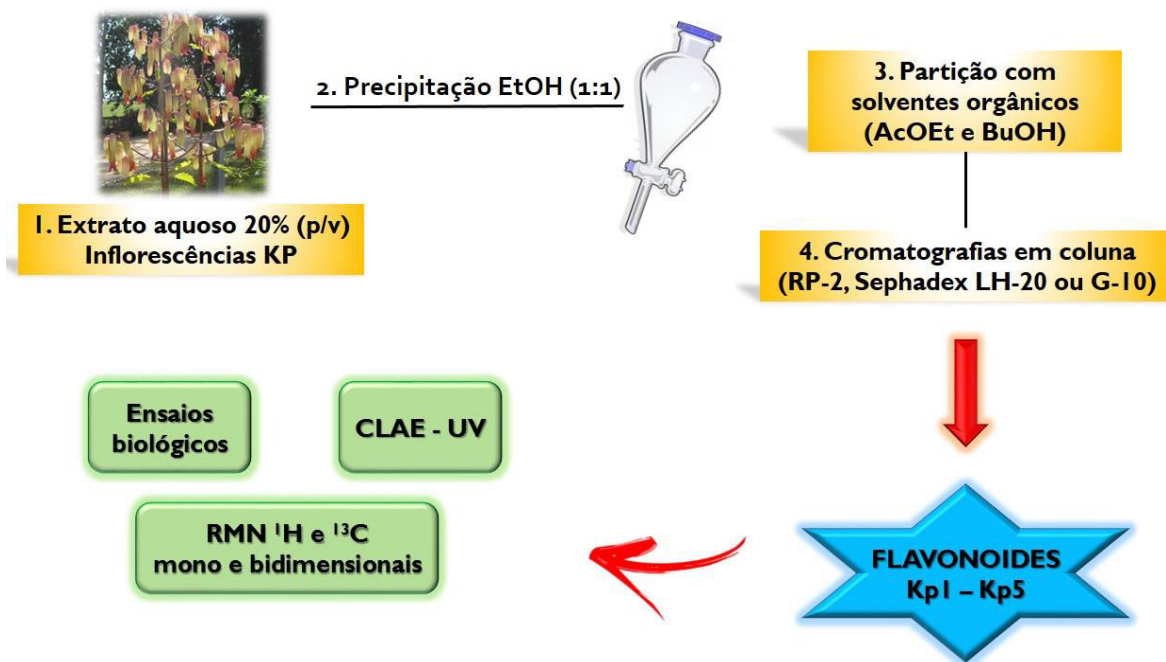
#### 3.1 Material Botânico

As inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon foram coletadas a partir de espécimes cultivadas no campus da UFRJ (Universidade Federal do Rio de Janeiro) em Setembro de 2011, e identificadas pela botânica Maria de Fátima Freitas no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Um voucher do espécime (292.697) foi depositado no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

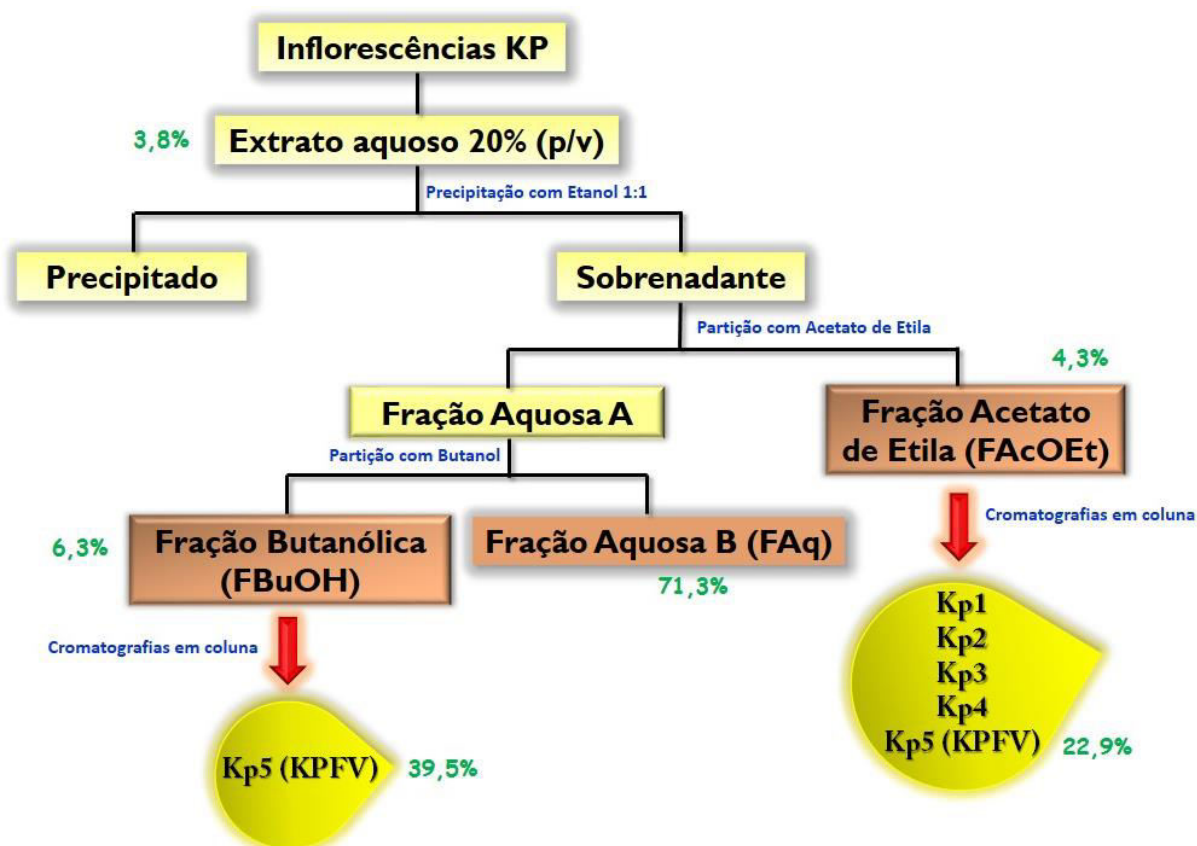
##### 3.1.1 Extração e Isolamento

As inflorescências frescas de KP (2,52 kg) foram trituradas e extraídas com água destilada a 20% p/v durante 30 minutos a 50°C. O rendimento do extrato liofilizado das inflorescências foi de 3,82% (90,2 g) do material fresco inicial. O extrato seco das inflorescências foi ressuspendido em água destilada (2,1 L) e precipitado com etanol (EtOH) (1:1). A fração solúvel (sobrenadante) (76,9 g) foi particionada com acetato de etila (1 x 550 mL; 2 x 225 mL), gerando uma fração acetato de etila: FAcOEt (5,58 g; 5,8%, p/p do extrato seco) e uma fração aquosa residual A (71,38g). Em seguida, essa fração aquosa residual A (71,38g) foi então particionada com *n*-butanol (1 x 550 mL; 2 x 225 mL), gerando uma fração butanólica: FBuOH (12,35 g; 13,7%, p/p do extrato seco) e uma fração aquosa residual B: FAq (9,03g). As soluções estoque foram esterilizadas através de filtração em membrana Millipore 0,22 µm, separadas em alíquotas e congeladas a -20°C. Uma alíquota da FAcOEt (5,0 g) foi ressuspendida em água destilada (5 mL) e purificada em uma série de cromatografias em coluna, levando ao isolamento dos flavonoides codificados como Kp1-Kp5. A fração butanólica também foi purificada através de cromatografias em coluna e levou ao isolamento de maior massa do flavonoide inicialmente codificado como KP5 (KPFV). Os rendimentos das FAcOEt, FBuOH e FAq a partir do EAFL foram de 4,28%, 6,27%, e 71,27% respectivamente. Conforme descrito previamente (COUTINHO *et al.*, 2012), o flavonoide [quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo] (KPFV), alvo de estudo nesta tese, foi isolado de ambas as frações (rendimento: 22,9% e 39,5% da FAcOEt e FBuOH, respectivamente), com 95% de pureza (tempo de retenção de 31,2 minutos) e demonstrando pH tendendo ao ácido (Figuras 11 e 12).





**Figura 11.** Esquema geral de obtenção dos flavonoides e seu processamento analítico. A partir das inflorescências de KP obteve-se o extrato aquoso, o qual foi precipitado em etanol (1:1) e posteriormente particionado em acetato ou butanol. As frações geradas pela partição foram processadas por cromatografia em coluna, identificando-se diversos flavonoides (KP1-KP5).



**Figura 12.** Esquema ilustrativo mostrando as etapas para isolamento dos flavonoides (em verde estão indicados os rendimentos dos compostos) da *Kalanchoe pinnata*.

### 3.2 Drogas, reagentes e solventes

Água destilada, solução salina 0,9%, ácido acético, meloxicam, indometacina, dexametasona, carragenina, óleo de cróton, acetona, solução de tampão fosfato salina (PBS) de pH = 7,0, heparina, líquido de Türk, ELISA Kit Mouse TNF-alpha (RayBio<sup>®</sup>), Colometric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical<sup>®</sup>). Extrato aquoso das inflorescências de *Kalanchoe pinnata* (EAFL), Fração butanólica (FBuOH), Fração acetato de etila (FAcOEt), Fração aquosa (FAq) e Flavonoide majoritário - [quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo] - (KPFV). Os compostos derivados das inflorescências de KP foram administrados em doses proporcionais aos respectivos rendimentos durante o processo de extração. Por sua vez, as doses dos controles positivos foram baseadas em estudos prévios inerentes a cada substância. Estes estudos consideram resultados obtidos na formação de curva padrão, determinando assim a dose ideal da droga para cada condição experimental.

### 3.3 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, albinos, machos, pesando entre 25 e 35 g, adultos, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas (caixa de polipropileno de dimensões: 30 x 19 x 13cm), em número máximo de 5 animais por gaiola. As gaiolas foram identificadas individualmente com etiquetas penduradas externamente, e mantidas em salas climatizadas ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) sob ciclo de claro/escuro (12/12 h), sendo as luzes ligadas às 06:00 h, e com regime de água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986; PORTER, 1992). Para a execução dos experimentos padronizou-se o período mínimo de uma hora para adaptação dos animais ao laboratório.

Após as avaliações experimentais os animais foram submetidos à eutanásia adequada ao ensaio farmacológico instituído, bem como atendendo às diretrizes da CEUA institucional (UFRRJ), comissão ao qual este projeto foi submetido e aprovado (protocolo nº 002/2014).

### 3.4 Métodos Farmacológicos

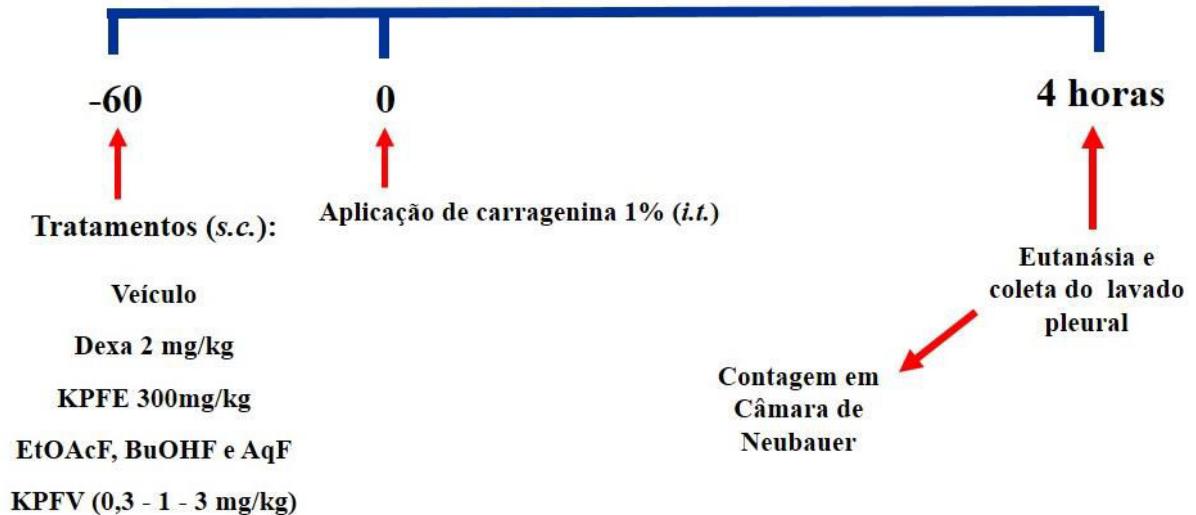
#### 3.4.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

##### 3.4.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Como primeira avaliação e servindo como método de triagem, foram realizados pré-tratamentos de grupos de 6 a 8 animais pela via oral (*p.o.*) com o veículo (água), com o EAFL (500 mg/kg, 1 g/kg e 2 g/kg) ou com o controle positivo meloxicam (0,3 mg/kg).

Em ensaios posteriores, modificando-se a via de administração do extrato, grupos de 5 a 6 camundongos foram tratados pela via subcutânea (*s.c.*) com o veículo (salina), EAFL (30, 100 ou 300 mg/kg), KPFV (1, 3 ou 10 mg/kg) ou com o controle positivo indometacina (10 mg/kg).





**Figura 14.** Cronologia experimental do teste da pleurisia induzida por carragenina.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM do número de leucócitos totais  $\times 10^6/\text{mL}$ , considerando a fórmula a seguir:

**$\Sigma$  nº leucócitos dos quadrantes  $\times 50 \times 1000$**

- Sendo:
  - 50 = valor referente ao volume total da Câmara de Neubauer
  - 1000 = valor referente ao lavado pleural (1mL)

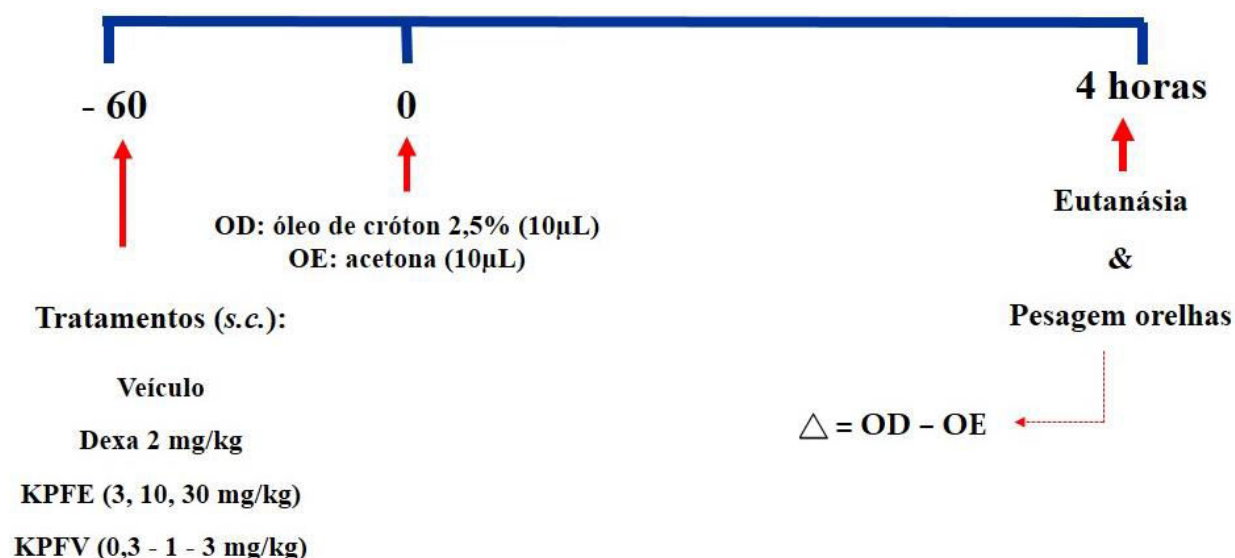
#### 3.4.2.1.1 Dosagem *ex vivo* da Mieloperoxidase

Utilizando alíquotas do lavado pleural obtidas no teste da pleurisia (EAFL, 300 mg/kg), e diante da viabilidade de execução do ensaio, foi realizada a dosagem da enzima mieloperoxidase, sendo transferidos 20  $\mu\text{L}$  do lavado para os poços de microplacas (SALEH *et al.*, 1999). A reação foi iniciada com a adição de 180  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato pH = 6,0 contendo: 0,167 mg/mL de o-dianisidina 2HCl e 0,0005%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e após 15 minutos esta foi interrompida com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de azida sódica a 1%. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm, e 100  $\mu\text{L}$  dos sobrenadantes transferidos para os poços de microplacas. As absorvâncias foram determinadas em leitor de ELISA no comprimento de onda de 450 nm. Foi realizada uma curva-padrão com peroxidase (0,625–100 mU/mL) para determinar a concentração de mieloperoxidase presente nas amostras.

#### 3.4.2.2 Teste do edema de orelha induzida por óleo de cróton

Grupos de 8 a 11 camundongos foram tratados pela via subcutânea (s.c.) com o veículo (salina), EAFL (3, 10 ou 30 mg/kg), KPFV (0,3; 1,0 ou 3,0 mg/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg). Trinta minutos após os tratamentos, foram aplicados topicamente 20

$\mu\text{L}$  de óleo de cróton (2,5% v/v em acetona) na orelha direita e 20  $\mu\text{L}$  de acetona (veículo) na orelha esquerda. Quatro horas após, os animais foram eutanasiados para a retirada de fragmentos de 6 mm de diâmetro (utilizando-se punch) de cada orelha e posterior pesagem em balança analítica (Figura 15). Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  EPM da diferença de peso, em miligramas, entre as orelhas direita e esquerda ( $\Delta$ ) (TUBARO *et al.*, 1986; ZANINI JUNIOR *et al.*, 1992).



**Figura 15.** Cronologia experimental do teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.

### 3.4.3 Avaliação de mecanismos de ação

#### 3.4.3.1 Dosagem de TNF- $\alpha$

Utilizando alíquotas do lavado pleural obtidas no teste da pleurisia, foi avaliada a habilidade do EAFL (300 mg/kg) e do KPFV (3 mg/kg) em inibir a formação da citocina inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), sendo o grupo tratado com dexametasona (2 mg/kg) utilizado como controle positivo. Para isto, foram utilizados kits de imunoenensaio enzimático (ELISA Kit Mouse TNF-alpha, RayBio<sup>®</sup>), a fim de mensurar a concentração desta citocina no lavado pleural. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da concentração de TNF- $\alpha$  (pg/mL) (PASSOS *et al.*, 2007).

#### 3.4.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

Para avaliação da efetividade *in vitro* do composto flavonoide majoritário (KPFV) e do controle positivo indometacina sobre a atividade das cicloxigenases, foram utilizados kits de imunoenensaio enzimático (Colometric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical<sup>®</sup>, Catálogo n<sup>o</sup> 760111). Através do método de ELISA foi determinado o percentual de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 pelo KPFV (concentrações de 3,125 a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e pela indometacina (concentrações de 2,5 a 80  $\mu\text{g/mL}$  para COX-1, e de 18,75 a 600  $\mu\text{g/mL}$  para COX-2).

## 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

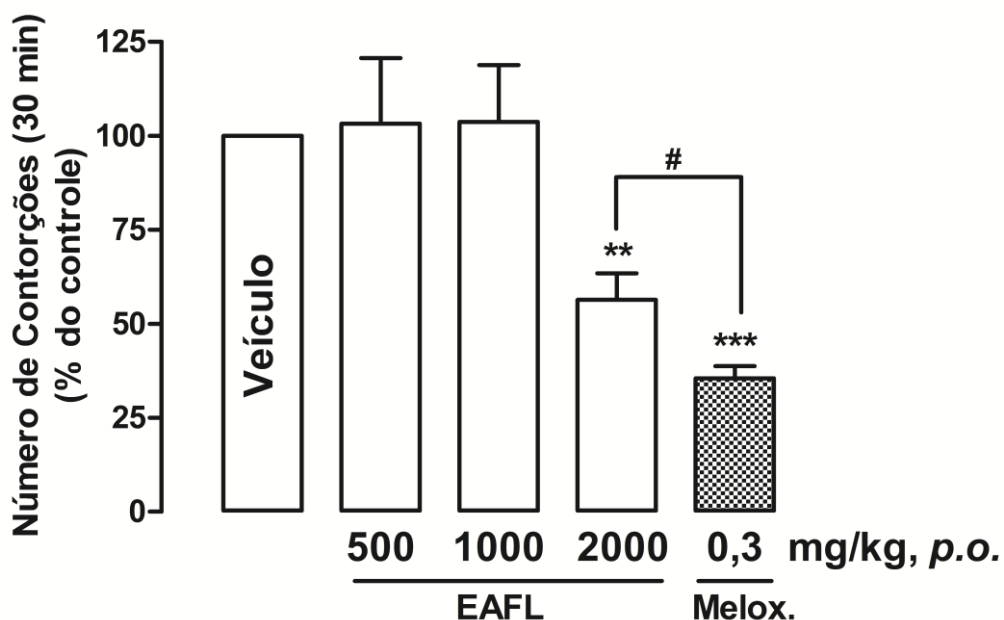
Em todos os métodos de avaliação farmacológica foi utilizado o programa *GraphPad Prism 5* para realização da análise estatística. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey. Foram admitidas diferenças significativas a partir de  $p < 0,05$  (SOKAL; ROHLF, 1981).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

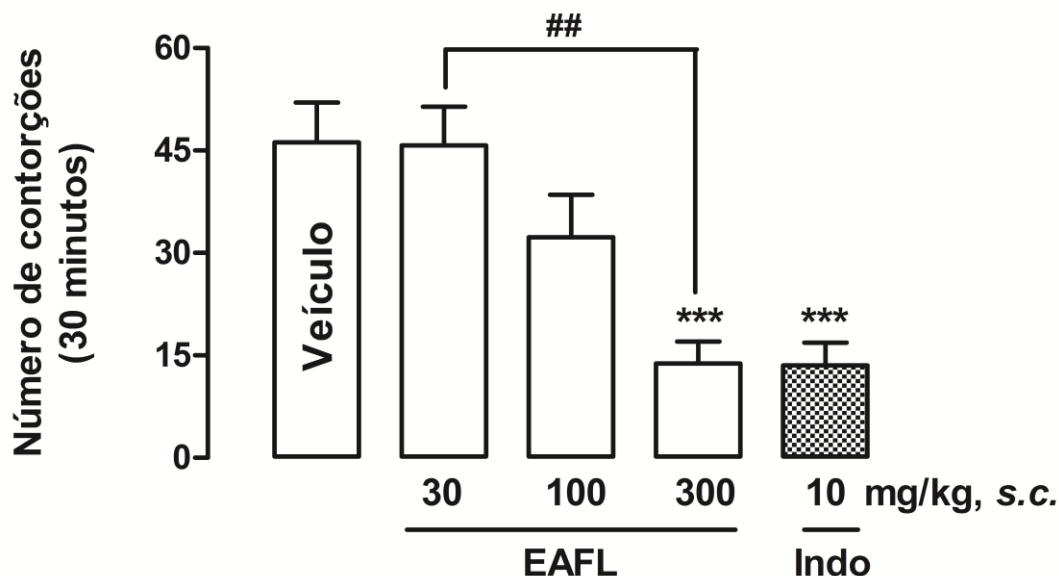
#### 5.1.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Como resultado do primeiro ensaio de triagem para avaliação da atividade antinociceptiva do extrato das inflorescências de KP, observou-se que a administração oral do EAFL (2g/kg) e do controle positivo meloxicam (0,3 mg/kg), inibiu o número de contorções abdominais em 43,6% ( $56,4 \pm 7,0$  contorções) e 64,5% ( $35,5 \pm 3,3$  contorções), respectivamente em relação ao grupo veículo ( $52,3 \pm 4,1$  contorções), indicando a presença de princípios com atividade antinociceptiva neste extrato. A administração das doses de 500 mg/kg ou de 1 g/kg não produziram diferenças significativas no número de contorções abdominais quando comparadas ao veículo (Figura 16).



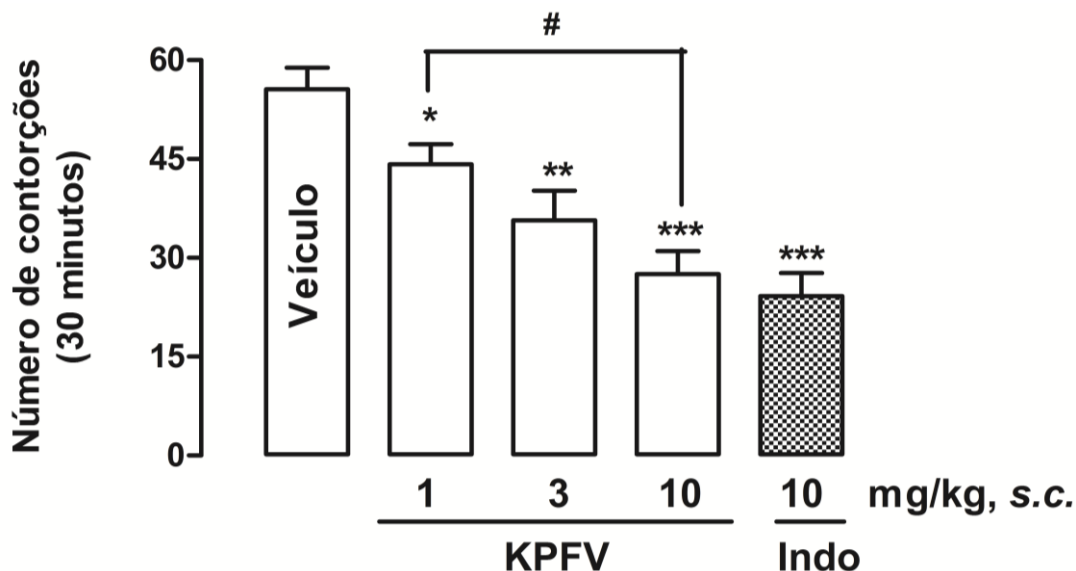
**Figura 16.** Efeito dos tratamentos por via oral com o EAFL (500 mg/kg, 1 g/kg e 2 g/kg) ou com o meloxicam (Melox.) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. # $p < 0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 6 a 8 camundongos.

Durante uma etapa posterior, considerando-se a tentativa de utilização de uma via que permitisse o uso de doses menos elevadas, observou-se que o pré-tratamento subcutâneo (*s.c.*) dos animais com EAFL (100 e 300 mg/kg), foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em 30,1% ( $32,3 \pm 6,2$  contorções) e 70,1% ( $13,8 \pm 3,2$  contorções) respectivamente ( $DI_{50} = 164,8$  mg/kg), comparativamente ao grupo veículo ( $46,2 \pm 5,8$  contorções), enquanto o controle positivo indometacina (10 mg/kg) reduziu em 70,8% ( $13,5 \pm 3,4$  contorções) o número de contorções abdominais (Figura 17). A dose de 30 mg/kg do EAFL foi inefetiva neste ensaio.



**Figura 17.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o EAFL ou com a indometacina (Indo) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. ## $p < 0,01$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 a 6 camundongos.

Os grupos de animais tratados com o KPFV (1, 3 e 10 mg/kg) também demonstraram redução número de contorções abdominais, com percentuais de inibição de 20,5 ( $44,2 \pm 3,1$  contorções), 35,8% ( $35,7 \pm 4,5$  contorções) e 50,5% ( $27,5 \pm 3,5$  contorções), respectivamente ( $DI_{50} = 9,4$  mg/kg), quando comparados ao grupo veículo ( $55,6 \pm 3,3$  contorções). Conforme padrão para este ensaio, o grupo controle positivo indometacina (10 mg/kg) reduziu o número de contorções, sendo a inibição de 56,5% ( $24,2 \pm 3,5$  contorções) (Figura 18).



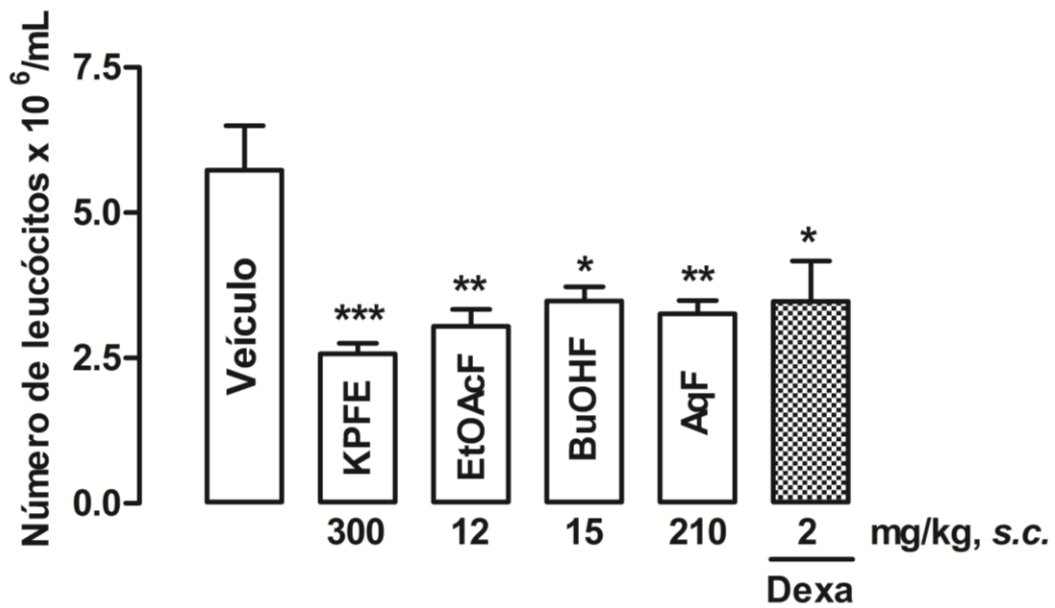
**Figura 18.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o KPFV ou com a indometacina (Indo) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo. # $p < 0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 5 a 6 camundongos.

## 5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

### 5.2.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina

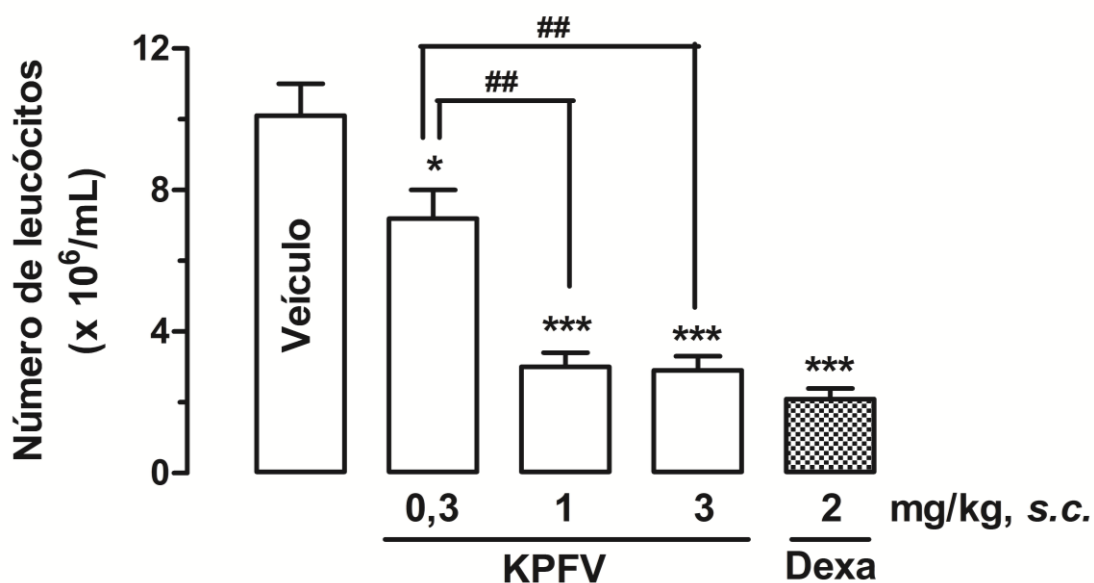
Neste ensaio, o pré-tratamento com o EAFL (300 mg/kg), com as frações acetato de etila - FAcOEt (12 mg/kg), butanólica - FBUOH (15 mg/kg) e aquosa - FAq (210 mg/kg) ou com o controle positivo dexametasona, reduziu a migração leucocitária para a cavidade pleural em 56,1% ( $2,5 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 47,3% ( $3,0 \pm 0,3$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 39,6% ( $3,4 \pm 0,3$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 43,1% ( $3,2 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) e 43,9% ( $3,2 \pm 0,6$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ( $5,7 \pm 0,7$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) (Figura 19).





**Figura 19.** Efeito dos tratamentos por via subcutânea com o EAFL, suas frações (FAcOEt, FBuOH e FAq) ou com a dexametasona (Dexa) no número de leucócitos migrados para a cavidade pleural na pleurisia induzida por carragenina. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

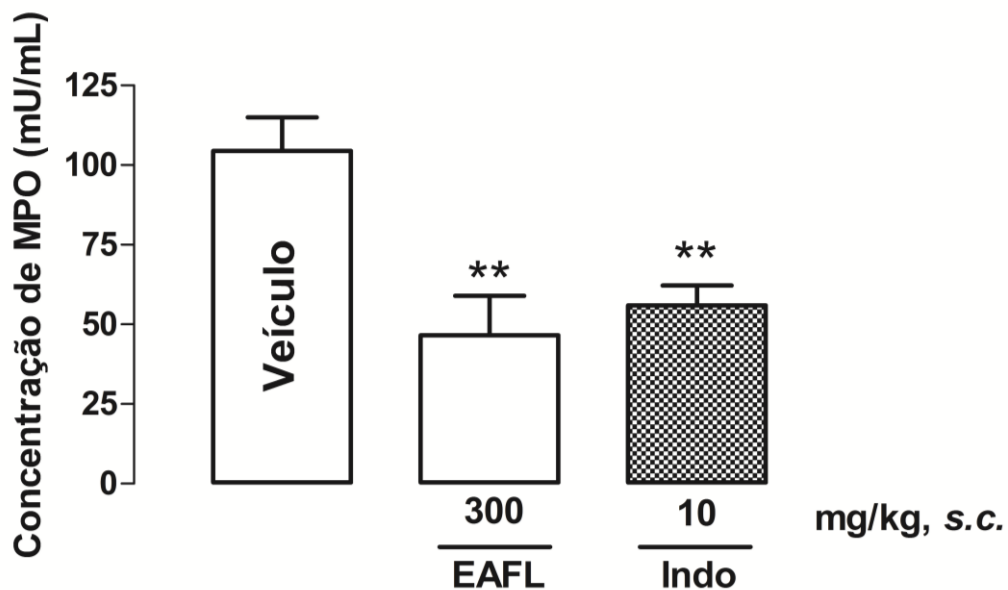
Ainda utilizando o ensaio da pleurisia, foi observado que o flavonoide majoritário KPFV (0,3; 1 e 3 mg/kg) produziu uma redução dose-efeito da migração leucocitária de 28,7% ( $7,2 \pm 0,8$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 70,3% ( $3,0 \pm 0,4$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) e 71,3% ( $2,9 \pm 0,4$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) respectivamente, enquanto o controle positivo dexametasona reduziu a migração em 79,2% ( $2,1 \pm 0,3$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) quando comparado ao grupo veículo ( $10,1 \pm 0,9$  leucócitos  $\times 10^6/\text{mL}$ ) (Figura 20).



**Figura 20.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o flavonoide KPFV ou com a dexametasona (Dexa) no número de leucócitos migrados para a cavidade pleural na pleurisia induzida por carragenina. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo. ## $p < 0,01$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

### 5.2.1.1 Dosagem *ex vivo* da Mieloperoxidase

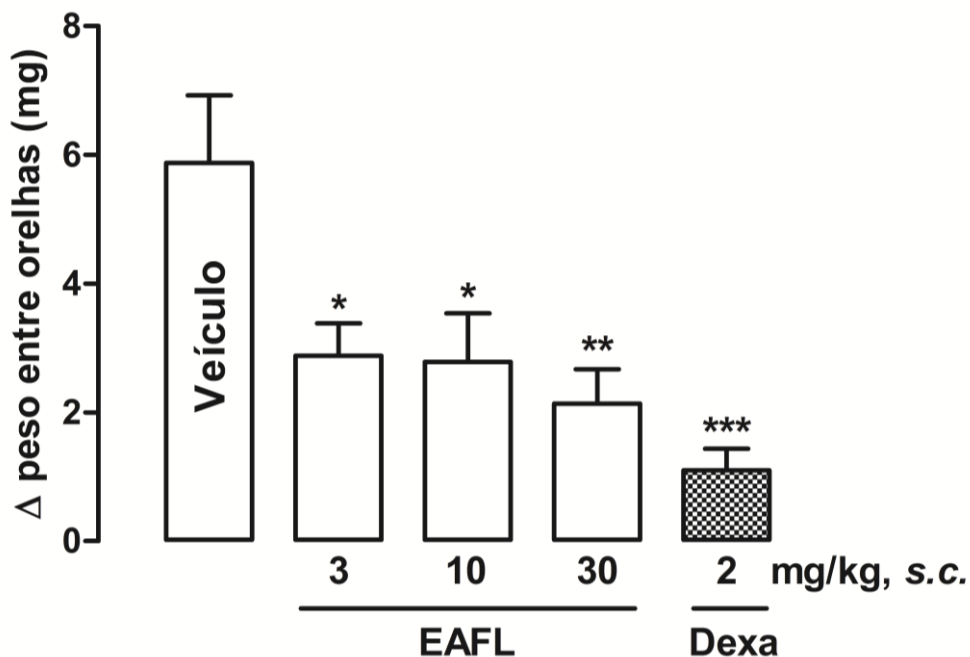
O tratamento prévio com o EAFL na dose de 300 mg/kg (*s.c.*) ou com a indometacina (10 mg/kg) foi capaz de reduzir a concentração de MPO no exsudato pleural em 55,9% ( $46,6 \pm 12,3$  mU/mL) e 46,4% ( $56,0 \pm 6,2$  mU/mL) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ( $104,5 \pm 10,6$  mU/mL), indicando relação com a migração de neutrófilos durante o experimento de pleurisia induzida por carragenina, células estas que foram responsáveis pela liberação da enzima dosada (Figura 21).



**Figura 21.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFL ou com a indometacina na concentração da mieloperoxidase no lavado pleural na pleurisia induzida por carragenina.  $**p < 0,01$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

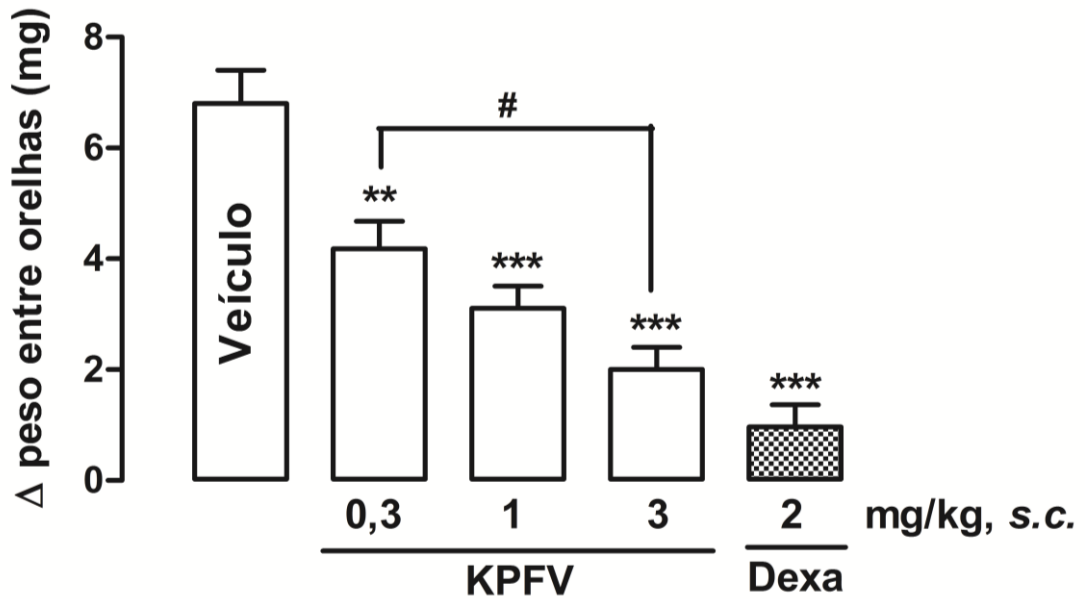
### 5.2.2 Teste do edema de orelha induzida por óleo de cróton

Neste ensaio, o EAFL (3, 10 e 30 mg/kg) produziu uma redução dose efeito no edema de orelha induzido por óleo de cróton de 50,8% ( $\Delta = 2,9 \pm 0,5$  mg), 54,2% ( $\Delta = 2,7 \pm 0,7$  mg) e 64,4% ( $\Delta = 2,1 \pm 0,5$  mg) respectivamente ( $DI_{50} = 4,3$  mg/kg), quando comparado ao grupo veículo ( $\Delta = 5,9 \pm 1,0$  mg), enquanto a dexametasona reduziu o edema em 81,4% ( $\Delta = 1,1 \pm 0,3$  mg) (Figura 22).



**Figura 22.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFL ou com a dexametasona (Dexa) sobre a diferença de peso ( $\Delta$ ) entre as orelhas direita (óleo de cróton, 2,5%) e esquerda (acetona) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-11 camundongos.

Em outro ensaio experimental, o pré-tratamento com o flavonoide majoritário KPFV (0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg) também produziu uma redução dose efeito do edema de orelha induzido por óleo de cróton, nos valores de 38,2% ( $\Delta = 4,2 \pm 0,4$  mg), 54,4% ( $\Delta = 3,1 \pm 0,4$  mg) e 70,6% ( $\Delta = 2,0 \pm 0,4$  mg) respectivamente ( $DI_{50} = 0,76$  mg/kg), quando comparado ao grupo veículo ( $\Delta = 6,8 \pm 0,6$  mg), enquanto o grupo dexametasona reduziu o edema em 85,3% ( $\Delta = 1,0 \pm 0,4$  mg) (Figura 23).

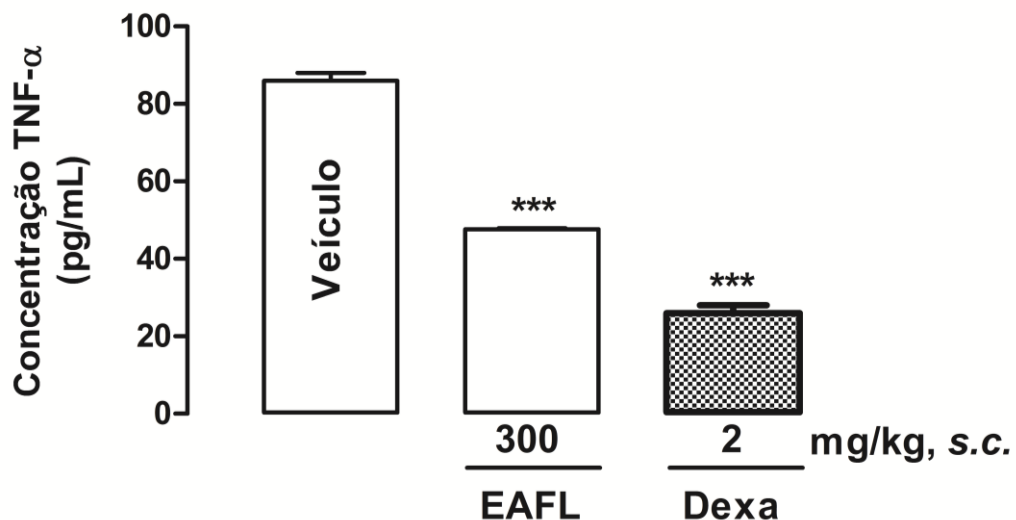


**Figura 23.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o flavonoide KPFV ou com a dexametasona (Dexa) sobre a diferença de peso ( $\Delta$ ) entre as orelhas direita (óleo de cróton, 2,5%) e esquerda (acetona) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferentes do grupo veículo. # $p < 0,05$  diferença entre os grupos interligados. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8-11 camundongos.

### 5.3 Avaliação de mecanismos de ação

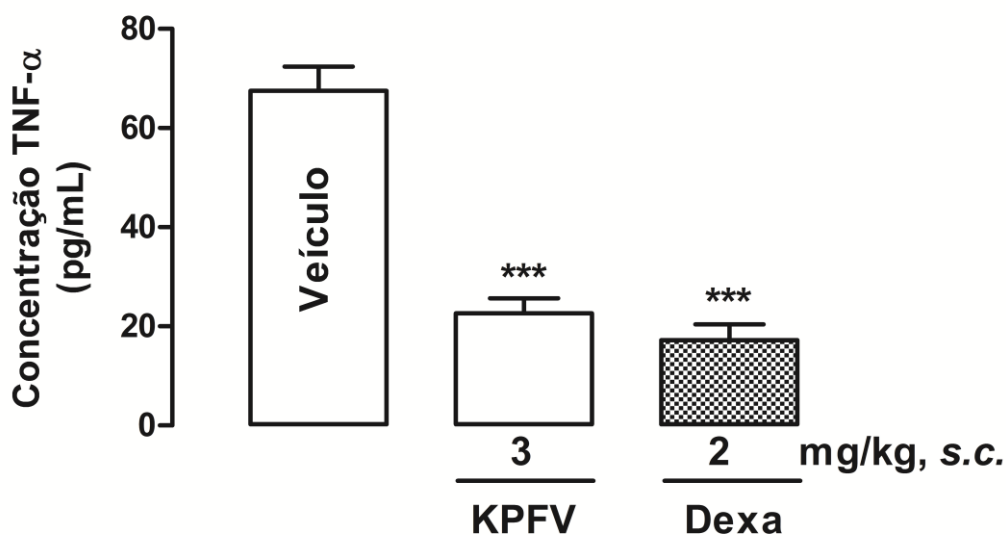
#### 5.3.1 Dosagem *ex-vivo* de TNF- $\alpha$

Após a injeção intrapleural de carragenina, foi possível observar que o pré-tratamento com o EAFL (300 mg/kg) ou com a dexametasona (2 mg/kg) reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural em 44,7% ( $47,6 \pm 0,3$  pg/mL) e 69,8% ( $26,0 \pm 2,0$  pg/mL), respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ( $86,0 \pm 2,0$  pg/mL) (Figura 24).



**Figura 24.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o EAFL ou com a dexametasona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural, determinada por ELISA. \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

Em outra etapa experimental, observou-se que o flavonoide KPFV (3 mg/kg, *s.c.*) também foi capaz de reduzir a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural, com inibição de 66,6% ( $22,6 \pm 3,1$  pg/mL) quando comparado ao seu veículo ( $67,5 \pm 4,9$  pg/mL). Conforme esperado, o grupo tratado com dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) também reduziu a concentração de TNF- $\alpha$  em 74,5% ( $17,2 \pm 3,2$  pg/mL) (Figura 25).



**Figura 25.** Efeito dos tratamentos pela via subcutânea com o KPFV ou com a dexametasona sobre a concentração de TNF- $\alpha$  no exsudato pleural, determinada por ELISA. \*\*\* $p < 0,001$  significativamente diferente do grupo veículo. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. de 8 camundongos.

### 5.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

A atividade enzimática de COX-1 e COX-2 foi inibida pelo flavonoide KPFV de maneira concentração dependente, conforme indicado na Tabela 1. O valor da concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) calculado para COX-1 foi de  $3,8 \times 10^{-5}$ M ( $22,1$   $\mu$ g/mL). O máximo de inibição da COX-2 alcançado pelo KPFV foi de 43,5% ( $50$   $\mu$ g/mL), logo se pode indicar que o valor de sua  $CI_{50}$  para COX-2 foi maior que  $8,4 \times 10^{-5}$ M (Tabela 1). O controle positivo indometacina também inibiu a atividade de ambas as enzimas COX-1 e COX-2, sendo o valor da  $CI_{50}$  para COX-1 foi de  $5,9$   $\mu$ g/mL e de  $31,2$   $\mu$ g/mL para COX-2, com IS de 0,19.

**Tabela 1.** Efeito do flavonoide KPFV e do controle positivo Indometacina (Indo) sobre a atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2.

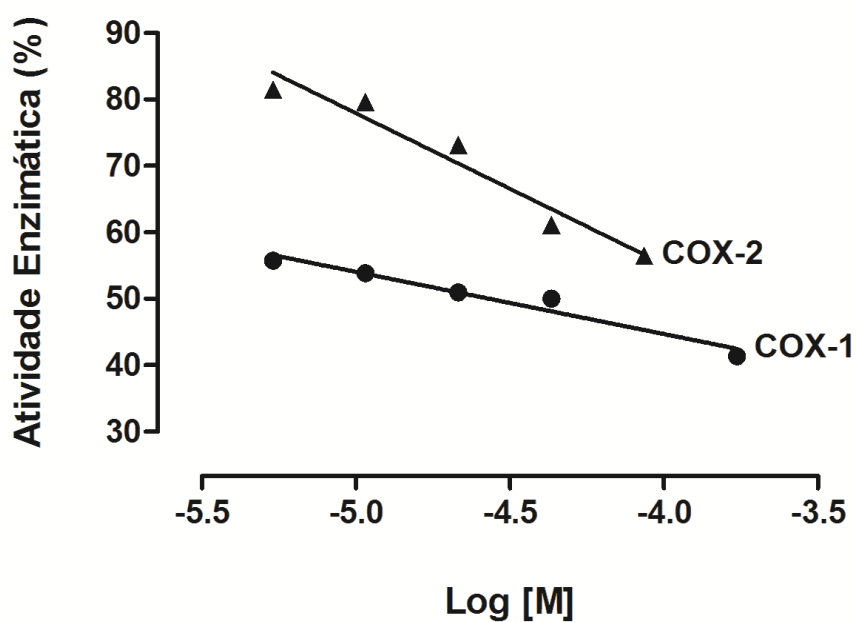
Concentração de KPFV (µg/mL)	Inibição (%)	
	COX-1	COX-2
3,125	44,2	18,5
6,25	46,1	20,4
12,5	49,0	26,9
25,0	50,0	38,9
50,0	N/D	43,5

Concentração de Indo (µg/mL)	COX-1	COX-2
5,9	50,0	-
31,2	-	50,0

(N/D – não detectado)

O índice de seletividade (IS;  $IC_{50} \text{ COX-1} / IC_{50} \text{ COX-2}$ ), foi inferior a 0,44, indicando uma inibição moderadamente preferencial para COX-1 (Figura 26).

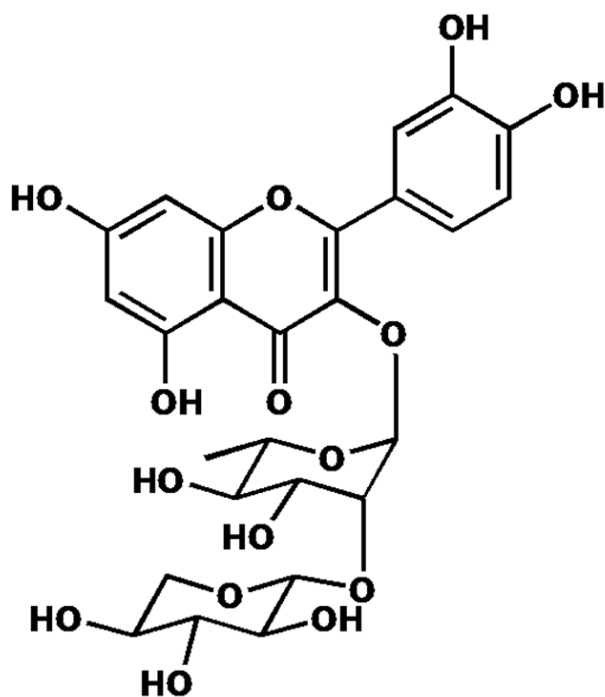


**Figura 26.** Efeito do flavonoide KPFV sobre a atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2, demonstrando o índice de seletividade (IS) preferencial para COX-1.

## 6 DISCUSSÃO

Através de ampla revisão bibliográfica dos estudos sobre *Kalanchoe pinnata*, torna-se perceptível que esta espécie vem sendo relacionada a inúmeras atividades biológicas, destacando dentre estas atividades, a atividade anti-inflamatória, que foi o direcionamento do presente trabalho. Nesses estudos, a maioria utilizou as folhas de KP para investigação da atividade anti-inflamatória (HEMA *et al.*, 1986; OJEWOLE, 2005; SOUSA *et al.*, 2005). Hema e colaboradores (1986) atribuíram esta atividade à presença de substâncias como o sitosterol e álcoois alifáticos sem testar a eficácia de compostos isolados, ocorrendo o mesmo com alguns estudos envolvendo flavonoides (OJEWOLE, 2005; SOUSA *et al.*, 2005). Por outro lado, em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa interdisciplinar demonstrou que flavonoides isolados das folhas de KP possuem atividade significativa contra a leishmaniose, asma e em modelos de alergia através de mecanismos imunomodulatórios (COSTA *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2012), como por exemplo a inibição da produção de citocinas IL-2 e IL-4, bem como na redução da proliferação de células T (CI<sub>50</sub> 38,8µg/mL) (COUTINHO *et al.*, 2012).

Dando continuidade às pesquisas e de maneira inédita, passamos o foco às inflorescências de KP, uma vez que esta parte da planta é potencialmente detentora de uma ampla variedade e quantidade de flavonoides. Estudos prévios de nosso grupo sobre a composição química das inflorescências de KP levaram ao isolamento de quatro flavonoides minoritários: miquelianina (*quercetina 3-O-β-glicuronopiranosídeo*), isoquercitrina (*quercetina 3-O-β-glicopiranosídeo*), quercitrina (*quercetina 3-O-α-L-ramnopiranosídeo*) e quercetina (COUTINHO *et al.*, 2012). O flavonoide diglicosilado, citado nesta tese como KPFV (*quercetina 3-O-α-L-arabinopiranosil (1 → 2) -L-ramnopiranosídeo*) (Figura 27) demonstrou ser o mais abundante segundo Coutinho e colaboradores (2012), tanto nas folhas quanto nas inflorescências (1,87% de rendimento) de KP, sendo portanto nosso alvo de estudo. Vale ressaltar que o uso deste flavonoide com vista às suas propriedades antialérgicas foi patenteado pelos japoneses já em 1986 (ICHIKAWA, 1986).



**Figura 27.** Estrutura do flavonoide majoritário das inflorescências de KP: *quercetina 3-O-α-L-arabinopiranosil (1→2) α-L-ramnopiranosídeo* (KPFV).



Detalhando sobre a utilização farmacológica do flavonoide KPFV (mais especificamente um flavonol), podemos descrevê-lo como um agente anti-inflamatório e imunossupressor (CHERNG *et al.*, 2008; MORIKAWA *et al.*, 2003), em parte por inibir a expressão de citocinas e da enzima óxido nítrico sintase induzida por inibição da via do NF- $\kappa$ B (MORIKAWA *et al.*, 2003; BISCHOFF, 2008). Estas propriedades foram atribuídas por alguns autores (CHERNG *et al.*, 2008; MORIKAWA *et al.*, 2003) pela presença de uma quercetina aglicona em sua estrutura química. Além disto, outros estudos com esta quercetina demonstraram propriedades anti-inflamatórias na asma alérgica experimental em roedores (ROGERIO *et al.*, 2007). Este flavonoide é capaz ainda de inibir a produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e óxido nítrico em células estimuladas por IFN- $\gamma$  e LPS (KWON *et al.*, 2010).

Portanto, tratando-se de flavonoides e de acordo com as propriedades acima descritas, podemos inferir uma ampla gama de possibilidade de atividades farmacológicas a serem desvendadas para estes compostos. No presente estudo, tivemos como foco a atividade anti-inflamatória, uma vez que muitas doenças cursam com a inflamação e, ainda, o combate a este quadro é um dos propósitos da população que utiliza a *Kalanchoe pinnata* como planta medicinal.

Sendo a dor um dos sinais cardinais da inflamação e, além disto, um alvo importante de drogas anti-inflamatórias, o primeiro ensaio realizado neste estudo foi o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Estas contorções são resultantes de uma reação inflamatória aguda local (peritônio) induzida quimicamente pelo ácido acético (ZAKARIA *et al.*, 2006), o que leva à sensibilização de nociceptores responsivos à prostaglandinas (CHEN, 1993). Este teste é comumente utilizado como uma triagem para compostos potencialmente antinociceptivos (centrais e/ou periféricos), uma vez que é sensível a anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e também a opioides (FISCHER *et al.*, 2008). Nesta etapa inicial de nossos experimentos, escolhemos a via oral para administração do extrato das inflorescências de KP (EAFL). Contudo, observamos que a dose necessária para promover efeito antinociceptivo significativo foi extremamente elevada (Figura 12). Pode-se atribuir este tipo de resultado ao metabolismo de primeira passagem hepático que ocorre após a administração oral dos flavonoides. Evidências indicam que flavonoides glicosilados, como é o caso do KPFV, precisam ser desglicosilados antes de serem absorvidos. Porém, uma vez que são absorvidos estes flavonoides sofrem metabolismo de primeira passagem via conjugação, excretando seus conjugados logo em sequência, o que promove redução da biodisponibilidade destes compostos (MA *et al.*, 2014). Logo, este tipo de resultado levou-nos a considerar a possibilidade de mudança de via de administração para os ensaios seguintes, optando-se assim pela via subcutânea (*s.c.*). A partir deste ponto, observamos que o EAFL (*s.c.*) produziu inibição dose-efeito das contorções abdominais, indicando atividade antinociceptiva para o extrato. De maneira semelhante, porém utilizando uma dose 30 vezes menor, o KPFV também reduziu de maneira significativa o número de contorções, indicando fortemente o envolvimento deste flavonoide no efeito antinociceptivo do extrato das inflorescências de KP. Neste momento, a especificidade de efeito demonstrada por ambos os compostos (EAFL e KPFV), permitiu-nos sugerir a inibição de alguns produtos gerados a partir das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase, como por exemplo a PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> (PARVEEN *et al.*, 2007), o que justifica ainda a sensibilidade do teste a AINEs como a indometacina (ZAKARIA *et al.*, 2006).

Conduzindo os estudos na perspectiva de propriedades anti-inflamatórias como mandatórias para o efeito antinociceptivo observado no teste das contorções abdominais, realizamos o teste de pleurisia. Neste ensaio, a injeção intrapleural de carragenina (1%) induz o quadro inflamatório local pela liberação de diversos mediadores inflamatórios na cavidade pleural, como eicosanoides (prostaglandinas e leucotrienos) (AFONSO *et al.*, 2012), citocinas

(IL-1 e TNF- $\alpha$ ) (MAZZON; CUZZOCREA, 2007) e quimiocinas (SANZ; KUBES, 2012). Sob condições normais, o fluido pleural possui poucas células imunes (KROGEL; ANTONY, 1997), contudo, diante destes mediadores inflamatórios ocorre intensa migração leucocitária, alcançando um máximo entre 4 e 8 horas após a injeção de carragenina (ALMEIDA *et al.*, 1980), bem como formação de exsudato pleural (SANZ; KUBES, 2012). Este modelo de pleurisia simula diversas doenças pleurais, permitindo assim avaliar o efeito de substâncias que agem nos eventos celulares e vasculares da inflamação (BENINCÁ *et al.*, 2007). Estes eventos são representados principalmente pelo aumento da permeabilidade vascular, levando a um pequeno edema subpleural e, principalmente, diapedese de neutrófilos para o foco inflamatório (VINEGAR *et al.*, 1982). Um das características de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINES) é a capacidade de reduzir o número de células inflamatórias no exsudato pleural de maneira dose dependente (VINEGAR *et al.*, 1976), sendo este ensaio um bom indicativo deste tipo de ação anti-inflamatória. O presente estudo demonstrou a significativa atividade de EAFL, bem como das frações ricas em flavonoides – fração butanólica (FBuOH) e fração acetato de etila (FAcOEt) – na redução da migração leucocitária para a cavidade pleural induzida pela carragenina. Observou-se ainda atividade anti-inflamatória significativa quando os camundongos foram pré-tratados com a fração aquosa B (FAq), indicando que provavelmente esta fração reteve compostos biológicos importantes, que levaram à redução da contagem leucocitária. Considerando-se que a fração butanólica possui mesma origem (fração aquosa A) da fração aquosa B (após partição com o solvente orgânico butanol) (Figuras 10 e 11), os resultados encontrados são condizentes com a composição química das frações mencionadas. Por hora, a fração aquosa B ainda não teve sua composição elucidada, sendo necessários mais estudos fitoquímicos e de identificação das possíveis substâncias envolvidas com o efeito observado.

Dando continuidade ao ensaio da pleurisia com o EAFL, e considerando a viabilidade da execução do ensaio na época, o pré-tratamento dos animais com este extrato levou à redução na concentração de MPO no fluido pleural. Sendo a mieloperoxidase liberada de neutrófilos, e considerada uma enzima importante como marcador inflamatório (ROSEN; MICHEL, 1997), obtivemos mais um indício de atividade anti-inflamatória, agora suportado pela avaliação *in vitro* desta proteína.

Uma vez que o flavonoide KPFV demonstrou atividade anti-inflamatória semelhante ao extrato no teste da pleurisia, podemos atribuir sua presença nas frações (FBuOH – 39,5% e FAcOEt – 22,9%) à atividade anti-inflamatória destas. Além disto, o fato do extrato das inflorescências ter demonstrado atividade semelhante em doses 100 vezes maior que o flavonoide, indica o envolvimento desta quercetina neste efeito. Nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte pela ação do KPFV, as frações e o extrato de KP podem ter sido capazes de reduzir a síntese/liberação de mediadores quimioatraentes (responsáveis pela migração celular) como citocinas IL-1 e TNF- $\alpha$  (FRÖDE *et al.*, 2001), óxido nítrico, e leucotrienos (LTB<sub>4</sub>) (AFONSO *et al.*, 2012), bem como quimiocinas (SANZ; KUBES, 2012). Devemos considerar ainda a estrutura química do KPFV, uma vez que estudos anteriores (COUTINHO, 2013) relatam sua relação com a atividade anti-inflamatória deste composto. Dentre alguns fatores estruturais importantes, estão: a insaturação no anel C (posições 2-3), a presença de grupos hidroxilas, bem como a lipofilicidade do composto (COUTINHO, 2013).

Adicionalmente, ambos os pré-tratamentos com EAFL (300 mg/kg) e KPFV (3 mg/kg) no ensaio da pleurisia foram capazes de reduzir a concentração da citocina TNF- $\alpha$  no exsudato pleural. Estudos *in vitro* com células mononucleares de sangue periférico humano mostraram o papel da quercetina na modulação da produção e expressão gênica de TNF- $\alpha$ , sendo este efeito ligado à modulação das vias do NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e I- $\kappa$ B (NAIR *et al.*, 2006). Portanto, podemos sugerir, pelo menos em parte, que os efeitos anti-inflamatórios até então observados podem envolver a inibição desta citocina.

A atividade anti-inflamatória do EAFL e seu flavonoide majoritário também foi avaliada através do teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton. A aplicação tópica deste agente na orelha dos animais induziu uma resposta inflamatória aguda e consequente formação de edema. Este sinal característico é inicialmente mediado por histamina e serotonina, e mais tardiamente pela liberação de prostaglandinas (PARVEEN *et al.*, 2007). Um dos compostos presentes no óleo de cróton é conhecido como 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato, um éster que tem sido reportado pela estimulação dos fosfolípidos de membrana dependente de proteína quinase C, além da superexpressão de óxido nítrico sintase induzida e cicloxigenase-2 (LEE *et al.*, 2013). Observando nossos resultados neste modelo de inflamação, houve inibição dose-resposta do EAFL em doses 100 vezes menores (3 a 30 mg/kg) do que àquelas utilizadas no teste da pleurisia induzida por carragenina. De maneira semelhante, KPVF produziu redução na formação do edema e sua efetividade foi obtida com doses menores quando comparadas as do EAFL, sendo ativo a partir de 0,3 mg/kg. Estes resultados são extremamente promissores, visto que recentemente, Afzal e colaboradores (2012a) atribuíram a ação anti-inflamatória de *K. pinnata* a um novo derivado esteroidal, isolado das folhas desta espécie. Através do método do edema de pata induzido por carragenina, os autores demonstraram que o extrato das folhas de KP (400 mg/kg), bem como o esteroide (300 mg/kg) reduziram a inflamação em 87% e 84%, respectivamente (AFZAL *et al.*, 2012a). Contudo, observando as doses empregadas, foi necessário administrar uma dose do composto esteroide extremamente elevada em relação ao nosso estudo, obtendo-se os mesmos efeitos que o flavonoide KPFV. Outra questão interessante está no fato de que EAFL e KPFV produziram efeitos antiedematogênicos sob doses muito menores do que as utilizadas para obtenção do efeito antinociceptivo, o que nos sugere que a eficácia para os efeitos antiedematogênicos é mais elevada que a eficácia dos efeitos antinociceptivos, assim como observado para outros extratos e compostos isolados em estudos na literatura (LIMA *et al.*, 2013; KODITHUWAKKU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014).

Finalizando, por hora, a investigação de possíveis mecanismos de ação envolvidos com as atividades biológicas observadas, foi realizada a mensuração da atividade das enzimas cicloxigenases 1 e 2 sob influência do KPFV. Já é sabido que os flavonoides são capazes de diminuir a biossíntese de prostaglandinas através da inibição da via de formação das prostaglandinas (COX-1 e 2) (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2011). Sabe-se que as prostaglandinas possuem papel importante na determinação dos sinais cardinais da inflamação: dor, calor, rubor, edema e perda da função. A biossíntese de PGE<sub>2</sub>, a principal prostaglandina inflamatória, envolve três enzimas chave: fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), cicloxigenase (COX) e prostaglandina sintase (PGES) (MANCINI; BATISTA, 2011). Alguns flavonoides são capazes de reduzir a síntese de PGE<sub>2</sub> através da inibição da atividade destas enzimas, ou ainda através da inibição da expressão de enzimas induzidas pela inflamação, como a COX-2 e a PGES-1 microssomal (TAKANO-ISHIKAWA *et al.*, 2006; KOEBERLE *et al.*, 2009; HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2011). No presente estudo, observou-se que o KPFV, tanto quanto o controle positivo indometacina, inibiram a atividade de ambas as isoformas de cicloxigenase: COX-1 e COX-2. Desta forma, foi elucidado, pelo menos em parte, a influência deste composto sobre a cascata de mediadores inflamatórios provenientes do ácido aracônico.

Estes resultados indicam que tanto o EAFL quanto o KPFV produziram os efeitos anti-inflamatórios aqui observados através da inibição de COX. Contudo, o envolvimento de outros possíveis mecanismos que levem à inibição nas vias de síntese de prostaglandinas precisam ser investigados.

Vale ressaltar que a *quercetina 3-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo* (KPFV) é um composto inédito neste tipo de atividade, além de ser uma molécula pouco comum no reino vegetal (COUTINHO, 2013). Em estudos anteriores (COUTINHO *et al.*, 2012) este foi descrito como o flavonoide mais abundante tanto nas

inflorescências (1,87% p/p) quanto nas folhas de KP (2,26% p/p). Considerando este fato, podemos admitir que os resultados obtidos no presente estudo possam ser extrapolados para as folhas.

## 7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o presente estudo é inédito por investigar as propriedades farmacológicas das inflorescências de *Kalanchoe pinnata*, parte da planta pouco estudada mundialmente até o momento.

A investigação inicial do extrato da KP (EAFI) evidenciou o potencial antinociceptivo das flores através do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Esta atividade foi observada também para o flavonoide majoritário isolado da espécie, propiciando boa perspectiva para novas investigações neste mesmo estudo.

Foi demonstrado o potencial anti-inflamatório do EAFI, bem como das frações butanólica (FBUOH), acetato de etila (FAcOEt) e aquosa (FAq) e do KPFV através do teste da pleurisia induzida por carragenina. A ação antiedematogênica também mostrou-se presente tanto para o extrato quanto para o flavonoide, sendo esta mais uma evidência de atividade anti-inflamatória dos compostos derivados das flores de KP.

Através da redução dos níveis de TNF- $\alpha$ , bem como da inibição da atividade enzimática das cicloxigenases, parte dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades farmacológicas demonstradas foram elucidados.

Assim, os achados científicos aqui apresentados em relação às inflorescências da *K. pinnata* podem embasar algumas das indicações populares da espécie *K. pinnata* no âmbito de enfermidades que cursem com dor e inflamação. Estes dados podem ainda servir de base para estudos futuros, conduzindo à prospecção de novas moléculas bioativas com vistas à atividades analgésicas e anti-inflamatórias promissoras.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 5425-5430, 2000.

AFONSO, P. V.; JANKA-JUNTILA, M.; LEE, Y. J.; McCANN, C. P.; OLIVER, C. M.; AAMER, K. A.; LOSERT, W.; CICERONE, M. T.; PARENT, C. A. LTB4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. *Developmental Cell*, v. 22, p. 1079-1091, 2012.

AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K. R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia*, v. 83, n. 5, p. 853-858, 2012a.

AFZAL, M.; KAZMI, I.; KHAN, R.; SINGH, R.; CHAUHAN, M.; BISH, T.; ANWAR, F. *Bryophyllum pinnatum*: a review. *International Journal of Research in Biological Sciences*, v. 2, p. 143-149, 2012b.

AGATI, G.; AZZARELLO, R.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, v. 196, p. 67-76, 2012.

AKINPELU, D. A. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia*, v. 71, p. 193-194, 2000.

ALLORGE-BOITEAU, L. Madagascar centre de spéciation et d'origine Du genre *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). In: LOURENÇO, W. R. *Biogéographie de Madagascar*. Paris: Editions de L'ORSTOM, 1996.

ALMEIDA, A.P. ; BAYER, B. M. ; HORAKOVA, Z. ; BEAVEN, M. A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 214, n. 1, p. 74-79, 1980.

ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, A. G.; SOUZA, M. L. M.; LIMA, L. M. T. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; GONÇALVES DE MORAES, V. L.; COSTA, S. S. Isolation and chemical analysis of a fatty acid fraction of *Kalanchoe pinnata* with a potent lymphocyte suppressive activity. *Planta Medica*, v. 66, p. 134-137, 2000.

ALMEIDA, M. Z. Plantas medicinais, 2 ed. Salvador: Editora EDUFBA, 2003. p. 31, 147, 181.

ARANSIOLA, E. F., DARAMOLA, M. O.; IWALEWA, E. O.; SELUWA, A. M.; OLUFOWOBI, O. O. Anti-Diabetic Effect of *Bryophyllum pinnatum* Leaves. *International Journal of Biological, Life Science and Engineering*, v. 8, n. 1, 2014.

ARCOLINE, T. Plantas Medicinais, saúde e cura pelas plantas. Fitoterapia. São Paulo: On Line, 2003. n. 1, p. 34.

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

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*. v. 73, p. 599- 601, 1984.

BAE, H.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JIFON, J.; BHIMANAGOUDA, S. P. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry*, v. 130, p. 751-758, 2012.

BAILEY, L. H. The standard Cyclopedia of Horticulture (1&2), The Macmillan Company, New York, 1953.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.

BALZER, G. *Bryophyllum*. Ein Beitrag zu seina Pflanzen-morphologie. Berlin-Kleinmachnow, Gartenverlag. GmbH, 1949.

BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Saturable transport of peptides across the blood-brain barrier. *Life Science*, v. 41, p. 1319-1338, 1987.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; GRÉGORY, S.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2010.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. The Perception of Pain. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T. editors. Principles of Neuroscience. New York: Appleton and Lange; 2000. p. 472-491.

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. *Scientific American Brasil*, v. 50, p. 76-83, 2006.

BEERS, M. H.; BERKOW, R. Manual Merck. Ed. Roca Ltda, 2001.

BERGSTRÖM, S.; DUNER, H.; VON EULER, U. S.; PERNOW, B.; SJÖVALL, J. Observation on the effects on infusion of prostaglandin E in man. *Acta Physiologica Scandinavian*, v. 45, p. 145-151, 1959.

BENINCÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1097-1105, 2007.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences*, v. 55, p. 969-979, 1994.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, n. 9164, p. 1610-1615, 1999.

BESSON, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiology Revision*. v. 67, n. 1, p. 67-186, 1987.

BETSCHART, C.; VON MANDACH, U.; SEIFERT, B.; SCHEINERA, D.; PERUCCHINI, D.; FINK, D.; GEISSBÜHLER, V. Randomized, double-blind placebo-controlled trial with *Bryophyllum pinnatum* versus placebo for the treatment of overactive bladder in postmenopausal women. *Phytomedicine*, v. 20, p. 351-358, 2013.

BEVILACQUA, M. P.; POBER, J. S.; MAJEAU, G. R.; FIERS, W.; COTRAN, R. S. GIMBRONE, M. A. Jr. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 83, n. 12, p. 4533-4537, 1986.

BIESALSKI, H. K. Curr. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 10, p. 724-728, 2007.

BISCHOFF, S. C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 11, n. 6, p. 733-740, 2008.

BISWAS, S. K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; HOSEN, S. M. Z.; UDDIN, R.; RAHAMAN, S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 5, n. 10, p. 1258-1262, 2011.

BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C. J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, v. 385, n. 6618, p. 729-733, 1997.

BOITEAU, P. ; ALLORGE-BOUTEAU, L. *Kalanchoe* (Crassulacées) de Madagascar. *Systématique, écophysologie et phytochimie*. Karthala, Paris. 1995.

BOND, M. Pain education issues in developing countries and responses to them by the international association for the study of pain. *Pain Research & Management*, v. 16, p. 404-406, 2011.

BOPDA, O. S. M.; LONGO, F.; BELLA, T. N.; EDZAH, P. M. O.; TAÏWE, G. S.; BILANDA, D. C.; TOM, E. N. L.; KAMTCHOUING, P.; DIMO, T. Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.153, p. 400-407, 2014.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). *Journal of Thermal Biology*, v. 31, p. 208-219, 2006.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, v. 214, p. 149-160, 2008.

BRAMWELL, D. How many plant species are there? *Plant Talk*. Wiltshire, v. 28, p. 32, 2000.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 10, de 9 de março de 2010*. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010.

BRESNIHAN, B.; ALVO-GARCIA, J. M.; COBBY, M.; DOHERTY, M.; DOMLJAN, Z.; EMERY, P.; NUKI, G.; PAVELKA, K.; RAU, R.; ROZMAN, B.; WALT, I.; WILLIAMS, B.; AITCHISON, R.; McCABE, D.; MUSIKIC, P. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis and Rheumatism*, v. 41, p. 2196-2204, 1998.

BRICKS, L. F.; SILVA, C. A. A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não-hormonais. *Pediatria*, v. 27, n. 3, p. 181-193, 2005.

BROWNSTEIN, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 90, p. 5391-5393, 1993.

BUT, P. G.; MURAV'EV, R. A.; FOMINA, V. A.; ROGOVIN, V. V. Antimicrobial activity of myeloperoxidase from neutrophilic peroxisome. *Biology Bulletin*, v. 29, p. 266-270, 2002.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Ciência e Cultura*, v. 55, p. 37, 2003.

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*, v. 78, sup. 1, p. 98-106, 2008.

CARMO, J. MESSIAS DO. Idade Média. In: Revista da flora medicinal. Ano XIV (6), junho, Rio de Janeiro, 1947.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CARVALHO, M. M. M. J.; LODUCA, A.; PORTONI, A. G.; PIMENTA, C. A. M.; FIGUEIRÓ, J. A. B.; BORGES, L. M.; YENG, L. T.; TEIXEIRA, M. J.; KÓVACS, M. J.; MURTA, S. G.; LORDELLO, S. R. M.; GUIMARÃES, S. S. Dor - um estudo multidisciplinar. São Paulo. Summus Editorial, 1999.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; MEDRADO, V. C.; VIANNA, P. T. G. Biologia molecular dos receptores farmacológicos e seus sistemas efetores de interesse em anestesiologia. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 47, s. 2, p. 152-167, 1997.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 1429, 2008.



CEUSTERS, J.; GODTS, C.; PESHEV, D.; VERGAUWEN, R.; DYUBANKOVA, N.; LESCRINIER, E.; DE PROFT, M. P.; ENDE, W. V. D. Sedoheptulose accumulation under CO<sub>2</sub> enrichment in leaves of *Kalanchoe pinnata*: a novel mechanism to enhance C and P homeostasis? *Journal of Experimental Botany Advance*, p. 1-11, 2013.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 99, v. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, Q. *Methodology in pharmacological study on Chinese materia medica*. Beijing: 7 People's Medical Publishing House, 1993.

CHERNG, J.-M.; CHIANG, W.; CHIANG, L.-C. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry*, v. 106, n. 3, p. 944-950, 2008.

CHIBLI, L. A.; RODRIGUES, K. C. M.; GASPARETTO, C. M.; PINTO, N. C. C.; FABRI, R. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S.; VIEIRA, G. D-V.; SOUSA, O. V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 154, n. 2, p. 330-338, 2014.

CHOI, S. J.; LEE, K. H.; PARK, H. S.; KIM, S. K.; KOH, C. M.; PARK, J. Y. Differential expression, shedding, cytokine regulation and function of TNFR1 and TNFR2 in human fetal astrocytes. *Yonsei Medical Journal*, v. 46, p. 818-826, 2005.

CHUANG, H. H.; PRESCOTT, E. D.; KONG, H.; SHIELDS, S.; JORDT, S. E.; BASBAUM, A. I.; CHAO, M. V.; JULIUS, D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from ptdins(4,5) p2-mediated inhibition. *Nature*, v. 411, p. 957-962, 2001.

CLARK, I. A. How TNF was recognized as a key mechanism of Disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v. 18, n. 3-4, p. 335-343, 2007.

CLARK, T. P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 36, p. 1061-1085, 2006.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COPE, A. P.; ADERKA, D.; DOHERTY, M.; ENGELMANN, H.; GIBBONS, D.; JONES, A. C. Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatism*, v. 35, p. 1160-1169, 1992.

COSTA, S. S.; COUCEIRO, J. N. S. S.; SILVA, I. C. V.; MALVAR, D. C.; COUTINHO, M. A. S.; CAMARGO, L. M. M.; MUZITANO, M. F.; VANDERLINDE, F. A.

Flavonoids in the therapy and prophylaxis of flu: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 22, p.1111-1121, 2012.

COSTA, R.; FERNANDES, E. S.; MENEZES-DE-LIMA, O. Jr; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 27, p. 2967-2975, 2006.

COSTA, S. S.; MUZITANO, M. F.; CAMARGO, L. M. M.; COUTINHO, M. A. S. Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites. *Natural Product Communications*, v. 3, p. 2151-2164, 2008.

COSTA, S. S.; JOSSANG, A.; BODO, B. Propriétés biologiques et phytochimie des *Kalanchoe*. In: BOITEAU, P.; ALLORGE- BOITEAU, L. *Kalanchoe* (Crassulacées) de Madagascar, Systématique, écophysiologie et phytochimie. Paris: Edition Karthala, p.219-235, 1995.

COUTINHO, M. A. S. *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) e seus metabólitos: desenvolvimento de formulação farmacêutica e investigação do seu potencial terapêutico em feridas cutâneas. 2013. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais. Rio de Janeiro.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COUTINHO, M. A. S., MUZITANO, M. F., CRUZ, E. A., BERGONZI, M.C., KAISER, C.R., TINOCO, L.W., BILIA, A.R., VINCIERI, F.F., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S.S. Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a Rich Source of T Cell-Suppressive Flavonoids. *Natural Product Communications*, v. 6, n. 0, p. 1-5, 2012.

CRUZ, E. A.; DA-SILVA, S. A. G.; MUZITANO, M. F.; SILVA, P. M. R.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology*, v. 8, p. 1616-1621, 2008.

CRUZ, E. A.; REUTER, S.; MARTIN, H.; DEHZAD, N.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; BUHL, R.; STASSEN, M.; TAUBE, C. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*, v. 19, n. 2, p. 115-121, 2012.

CUI, Y-Q.; JIA, Y-J.; ZHANG, T.; ZHANG, Q-B.; WANG, X-M. Fucoidan Protects against Lipopolysaccharide-Induced Rat Neuronal Damage and Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators in Primary Microglia. *CNS Neurosciences & Therapeutics*, v. 18, p. 827-833, 2012.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, p. 343-356, 2005.

Di CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, v. 65, p. 337-353, 1999.

DI STASI, L. C. Plantas Mediciniais: arte e ciência. São Paulo: Unesp, 1995, 230p.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist. *International Reviews of Immunology*, v. 16, p. 457-499, 1998.

DINARELLO, C. A.; BERNHEIM, H. A.; DUFF, G. W.; LEE, H. V.; NAGABHUSHAN, T. L.; HAMILTON, N. A.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. *Journal of Clinical Investigation*, n. 74, p. 906-913, 1984.

DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A.; WOLFF, S. M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *Journal of the American Medical Association*, Chicago, v. 269, n. 14, p. 1829-1835, 1993.

DIXON, R. A.; DEY, P.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 55, p. 1-136, 1983.

DJOUHRI, L.; AL OTAIBI, N.; KAHLAT, K.; SMITH, T.; SATHISH, J.; WENG, X. Persistent hindlimb inflammation induces changes in activation properties of hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in rat C-fiber nociceptores *in vivo*. *Neuroscience*, v. 301, p. 121-133, 2015.

DRIESSEN, B. Pain: from sign to disease. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 6, issue 2, p. 120-125, 2007.

DUBNER, R.; BENNET, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annual Review of Neuroscience*, v. 6, p. 381-418, 1983.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; Van De PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB Journal*, v. 12, n. 12, p. 1063-1073, 1998.

ECOTERRAZAS.<http://www.ecoterrazas.com/blog/kalanchoe-daigremontiana-el-aranto-prodigioso>. 14 de Agosto de 2013.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunology Today*, Cambridge, v. 18, n. 10, p. 487-492, 1997.

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; CANCELLIERI, P.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, p. 1329-1338, 2010.

ENGLAND, S.; BEVAN, S. J.; DOCHERTY, R. J. Prostaglandin E<sub>2</sub> modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *The Journal of Physiology*, v. 495, p. 429-440, 1996.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 3152-3167, 2009.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends in pharmacological sciences*, v. 32, n. 2, p. 107-115, 2011.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. *Environmental Health Perspectives*, v. 109, p. 69, 2001.

FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 9, n. 1, p. 3-7, 2007.

FELDMAN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology*, v. 14, p. 397-440, 1996.

FERNANDES, J. M. *Kalanchoe brasiliensis* CAMBESS e *Kalanchoe pinnata* (LAMARCK) PERSON: Investigação química e avaliação da atividade antiofídica frente ao veneno de *Bothrops jararaca*. 2015. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Rio Grande do Norte.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S.; SALLES, S. L. M.; QUEIROZ, S. R. R.; NETO, N. E. H.; CORAZZA, R.; FARIAS, R. C. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FILHO, M. M. M.; RAHAL, S. C. O uso de antiinflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina. *Veterinária e Zootecnia*, v. 15, n. 3, p. 407-415, 2008.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, V.; DE SOUZA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 31, p. 235-239, 2008.

FITZGERALD, G. A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 2, n. 11, p. 879-890, 2003.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine*, v. 345, p. 433-442, 2001.

FONSECA, A. G. Avaliação da toxicidade do extrato das folhas de *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) em camundongos swiss. 2014. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Rio Grande do Norte.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, New York, v. 166, p. S4-S8, 2002.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

FRANCO, G. C. N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P. F. C.; LOPES, L. C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2006.

FRÖDE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. *Cytokine*, v. 13, p. 162-168, 2001.

FUNK, C. D.; FITZGERALD, G. A. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v. 50, p. 470-479, 2007.

GAIND, K. N.; GUPTA, R. L. Alkanes, Alkanols, Triterpens and Sterols of *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, p. 11, 1972.

GAIND, K. N.; GUPTA, R. L. Identification of Waxes from the Leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica*, v. 23, p. 193-197, 1974.

GAUT, J. P.; YEH, G. C.; TRAN, H. D.; BYUN, J.; HENDERSON, J. P.; RICHTER, G. M.; BRENNAN, M. L.; LUSIS, A. J.; BELAAOUAJ, A.; HOTCHKISS, R. S.; HEINECKE, J. W. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 98, p. 11961-11966, 2001.

GIBSON, P. R. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF- $\alpha$  the link? *Gut*, London, v. 53, n. 12, p. 1724-1725, 2004.

GIERSE, J. K.; McDONALD, J. J.; HAUSER, S. D.; RANGWALA, S. H.; KOBOLDT, C. M.; SEIBERT, K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, v. 271, p. 15810-15814, 1996.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics. 12<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2012.

GILROY, D. W.; NEWSON, J.; SAWMYNADEN, P. WILLOUGHBY, D. A.; CROXTALL, J. D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *FASEB J*, v.18, p. 489-498, 2004.

GOLDBERG, D. S.; MCGEE, S. J. Pain as a global public health priority, *BMC PublicHealth*, v. 11, p. 770, 2011.

GORDALIZA, N. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, v. 9, p. 767-776, 2007.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Fármaco*, v. 56, p. 683-687, 2001.

GUREJE, O.; VON KORFF, M.; SIMON, G. E.; GATER, R. Persistent pain and well-being: a world health organization study in primary care. *Jama*, v. 280, p. 147-151, 1998.

GURIB-FAKIM, A. Medical plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of medicine*, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; ASMAWI, M. Z.; VUORELA, P.; VAPAATALO, H.; MOILANEN, E. Effects of flavonoids on prostaglandin E2 production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages. *Planta medica*, v. 7, n. 13, p. 1504-1511, 2011.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, New York, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 413-421, 2002.

HANDA, S. S.; CHAWLA, A. S.; SHARMA, A. K. Plants with anti-inflammatory activity. *Fitoterapia*, LXIII, p. 3-31, 1992.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARDY, J. D.; WOLFF, H. G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *Journal of Clinical Investigation*, v. 29, n. 1, p. 115-140, 1950.

HARRIS, R. C.; BREYER, M. D. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, v. 281, F1-F11, 2001.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapy*, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAZEWINKEL, H. A. W.; VAN DEN BROM, W. E.; THEYSE, L. F. H.; POLLMEIER, M.; HANSON, P. D. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 84, p. 74-79, 2008.

HEMA, D.; TIDJANI, M.; BASSENE, E.; POSSET, L.; GIONO-BARBER, H. Plantes médicinales africaines XXIV étude de l'action anti-inflammatoire de *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae). *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, v. 3, p. 231-235, 1986.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. *Journal of Pediatrics*, v. 82, n. 5, 2006.

HILL, R. S. Fossil evidence for the onset of xeromorphy and scleromorphy in Australian Proteaceae. *Australian Systematic Botany*, v. 11, p. 391-400, 1998.

HOLLMAN, P. C. H.; BATAN, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedical Pharmacotherapy*, v. 51, p. 305-310, 1997.

HOSOMI, J. K.; GHELMAN, R.; QUINTINO, M. P.; DE SOUZA, E.; NAKAMURA, M. U.; MORON, A. F. Effects of chronic *Bryophyllum pinnatum* administration on Wistar rat pregnancy. *Forsch Komplementmed*, v. 21, n. 3, p. 184-189, 2014.

HUTCHINGS, A.; SCOTT, A. H.; LEWIS, G.; CUNNINGHAM, A. Zulu Medicinal Plants, An Inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, South Africa. 1996.

IASP - International Association for the Study of Pain. IASP Taxonomy, August 10<sup>th</sup>, 2011. Available from: <http://www.iasp-pain.org>.

ICHIKAWA, M.; OGURA, M.; IJIMA, T. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Patent 61, 118, 396 [86, 118, 319] (Cl. CO7H17/07), Apl 84/240, 282, 14 nov 1984; 4p- Chemical abstracts, 105, 178423q, 1986.

JONES, R. Nonsteroidal Anti-inflammatory drug prescribing: past, present and future. *American Journal of Medicine*, v. 110, p. 4-7, 2001.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. São Paulo: Manole, 2000.

JOSEPH, B.; SRIDHAR, S.; SANKARGANESH; JUSTINRAJ; EDWIN, B. T. Rare medicinal plant – *Kalanchoe pinnata*. *Research Journal of Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 322-327, 2011.

JULIUS, D; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, p. 203-210, 2001.

KALISCH, P. A. An overview of research on the history of leprosy. *International Journal of Leprosy*, v. 43, n. 2, p. 129-144, 1975.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A. K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: phytochemical and pharmacological profile: a review. *Pharmacognosy Review*, v. 3, p. 364-374, 2009.

KANG, H.; ECKLUND, D.; LIU, M.; DATTA, S. K. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoids, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Research and Therapy*, v. 11, p. 1-13, 2009.

KAWAI, M.; HIRANO, T.; HIGA, S.; ARIMITSU, J.; MARUTA, M.; KUWAHARA, Y. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergology*, v. 56, p. 113-123, 2007.

KELLY, E. H.; ANTHONY, R. T.; DENNIS, J. B. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. *British Journal of Anaesthesia*, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIEFER, D. M. Today's chemistry at work. 1997, December, 38.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. J. *Pharmacological Science*, v. 96, p. 229, 2004.

KING, J. N.; DAWSON, J.; ESSER, R. E.; FUJIMOTO, R.; KIMBLE, E. F.; MANIARA, W.; MARSHALL, P. J.; O'BYRNE, L.; QUADROS, E.; TOUTAIN, P. L.; LEE, P. Preclinical pharmacology of rofecoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, v. 32, p. 1-17, 2009.

KLEGGETVEIT, I. P.; NAMER, B.; SCHMIDT, R.; HELAS, T.; RÜCKEL, M.; ORSTAVIK, K.; SCHMELZ, M.; JORUM, E. High spontaneous activity of C-nociceptors in painful polyneuropathy. *Pain*, v. 153, p. 2040-2047, 2012.

KLINKHOFF, A. Biological agents for rheumatoid arthritis: targeting both physical function and structural damage. *Drugs*, v. 64, p. 1267-1283, 2004.

KODAMA, M.; DAVIS, M.; FAUSTMAN, D. L. The therapeutic potential of tumor necrosis factor for autoimmune disease: a mechanistically based hypothesis. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 1-13, 2005.

KODITHUWAKKU, N. D.; PAN, M.; ZHU, Y. L.; ZHANG, Y. Y.; FENG, Y. D.; FANG, W. R.; LI, Y. M. Antiinflammatory and antinociceptive effects of Chinese medicine SQ gout capsules and its modulation of pro-inflammatory cytokines focusing on gout arthritis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 3, p. 1071-1079, 2013.

KOEBERLE, A.; BAUER, J.; VERHOFF, M.; HOFFMANN, M.; NORTHOFF, H.; WERZ, O. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 388, n. 2, p. 350-354, 2009.

KOES, R.; VERWEIJ, W.; QUATTOCCHIO, F. Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Sciences*, v. 10, n. 5, p. 236-242, 2005.

KONG, J. M.; GOH, N. K.; CHIA, L. S.; CHIA, T. F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacology Sinica*, Beijing, v. 24, n. 1, p. 7-21, 2003.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

KROGEL, C.; ANTONY V. B. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *The European Respiratory Journal*, v. 10, p. 2411-2418, 1997.

KUMAR, S.; GUPTA, A.; PANDEY, A. K. *Calotropis procera* root extract has capability to combat free radical mediated damage. *ISRN Pharmacology*, v. 2013, pp 8, 2013.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. ROBBINS and COTRAN—Pathologic Basis of Disease, 8<sup>th</sup> edition, 2010, Elsevier.



KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KUO, P.C.; KUO, T. H.; SU, C. R.; LIOU, M. J.; WU, T. S. Cytotoxic principles and  $\alpha$ -pyrone ringopening derivatives of bufadienolides from *Kalanchoe hybrida*. *Tetrahedron*, v. 64, p. 3392-3396, 2008.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P. D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, v. 30, p. 208-217, 2007.

KWON, J. H.; KIM, J. H.; CHOI, S. E.; PARK, K. H.; LEE, M. W. Inhibitory effects of phenolic compounds from needles of *Pinus densiflora* on nitric oxide and PGE2 production. *Archives of Pharmacal Research*, v. 33, n. 12, p. 2011-2016, 2010.

LANDOLFI, R.; MOWER, R. L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochemistry and Pharmacology*, v. 33, p. 1525-1530, 1984.

LANZA, F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. *Journal of Molecular Medicine*, v. 6, p. 676-681, 1998.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *National Review of Immunology*, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LEE, H. N.; CHO, H. J.; LIM, D. Y.; KANG, Y.-H.; LEE, K. W.; PARK, J. H. Y. Mechanisms by which licochalcone e exhibits potent anti-inflammatory properties: studies with phorbol ester-treated mouse skin and lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 6, p. 10926-10943, 2013.

LEES, P.; LANDONI, M. F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P. L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *Journal of Veterinary of Pharmacology and Therapeutics*, v. 27, p. 479-490, 2004.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D. *et al.* Bioassay-guided evaluation of *Dioscorea villosa* - an acute and subchronic toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory approach. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, article 195, 2013.

LIMA, D. R. Medicamentos: passado, presente e futuro. In: Lima DR, editor. Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia. 1994. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 13.

LIU, K. C. S.; YANG, S. L.; ROBERTS, M. F.; PHILLIPSON, J. D. Eupafolin rhamnosides from *Kalanchoe gracilis*. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 970-974, 1989.

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

LOWERY, C. L.; HARDMAN, M. P.; MANNING, N.; HALL, R. W.; ANAND, K. J. Neurodevelopmental changes in fetal pain. *Seminars in Perinatology*, v. 31, n. 5, p. 275-282, 2007.

LÜTTGE, U. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism. *Annals of Botany*, v. 93, p. 629-652, 2004.

MA, Y.; ZENG, M.; SUN, R.; HU, M. Disposition of flavonoids impacts their efficacy and safety. *Current Drug Metabolism*, v. 15, n. 9, p. 841-864, 2014.

MACIEL, M. A. M. *Croton cajucara*: Uma escolha etnobotânica. 1997. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. Rio de Janeiro.

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

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; MARTINS, J. R.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A.; LAPP, A. J.; VANDERLINDE, F. A. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. Recent Progress in Medicinal Plants. *Phytochemistry and Pharmacology*, v. 8, p. 502-517, 2002b.

MAHOMOODALLY, M. F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A. H. Antimicrobial activities and phytochemical profiles of endemic medicinal plants of Mauritius. *Pharmaceutical Biology*, v. 43, n. 3, p. 237-242, 2005.

MANCINI, A. D.; DI BATTISTA, J. A. The cardinal role of the phospholipase A2/cyclooxygenase-2/ prostaglandin synthase/ prostaglandin E2 (PCPP) axis in inflammotaxis. *Inflammation Research*, v. 60, n. 12, p. 1083-1092, 2011.

MANI, R. N.; BREEDVELD, F. C.; KALDEN, J. R.; SMOLEN, J. S.; DAVIS, D.; MACFARLANE, J. D.; ANTONI, C.; LEEB, B.; ELLIOTT, M. J.; WOODY, J. N.; SCHAIBLE, T. F.; FELDMANN, M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 41, p. 1552-1563, 1998.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoids- a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 56, p. 296-301, 2002.

MARK, K. S.; TRICKLER, W. J.; MILLER, D. W. Tumor necrosis factor-alpha induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin release in brain microvessel endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 297, n. 3, p. 1051-1058, 2001.

MARRIAGE, P. B.; WILSON, D. G. Analysis of the Organic Acids of *Bryophyllum calycinum*. *Canadian Journal of Biochemistry*, v. 49, p. 82-95, 1971.

MARSHALL, E. J. P.; BROWN, V. K.; BOATMAN, N. D.; LUTMAN, P. J. W.; SQUIRE, G. R.; WARD, L. K. The role of weed in supporting biological diversity within crop fields. *Weed Research*, v. 43, p. 77-89, 2003.

MATHEWS, K. A.; DOHERTY, T.; DYSON, D. H.; WILCOCK, B.; VALLIANT, A. Nephrotoxicity in dogs associated with methoxyflurane anesthesia and flunixin meglumine analgesia. *The Canadian Veterinary Journal*, v. 31, p. 766-771, 1990.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Role of TNF-alpha in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respiratory Research*, v. 8, p. 75, 2007.

McADAM, B. F.; MARDINI, I. A.; HABIB, A.; BURKE, A.; LAWSON, J. A.; KAPOOR, S.; FITZGERALD, G. A. Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 105, p. 1473-1482, 2000.

McDERMOTT, M. F. TNF and TNFr biology in health and disease. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, v. 47, p. 619-635, 2001.

McMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurons in pain. *Pain*, v. 43, n. 3, p. 269-272, 1990.

MEDZHITOV, V. R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-435, 2008.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, v. 150, p. 971-979, 1965.

MESQUITA, L. A. F. Estudo da cicatrização cutânea causada pelo laser de CO<sub>2</sub> ultrapulsado em retalho dorsal de ratos. 2002. Dissertação – Faculdade Evangélica do Paraná. Curitiba.

METCALEF C. R., CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons I. Oxford at the Clarendon Press; 1950.

METHE, H.; ZIMMER, E.; GRIMM, C.; NABAUER, M.; KOGLIN, J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation*, Baltimore, v. 78, n. 9, p. 1324-1331, 2004.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 439, p. 175-182, 1998.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacological Reviews*, v. 52, p. 673, 2000.

MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A. N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, v. 4, n. 1, p. 86-104, 2014.

MILLER, A. L. Antioxidant flavonoids: Structure, function and Clinical Usage. *Alternative Medicine Review*, v. 1, p. 103-111, 1996.

MIRANDA, L. T. G. S. Uso da Tintura de Arnica em Feridas Cutâneas Abertas em Ratos. 2001. Dissertação – Universidade Federal de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. São Paulo.

MISRA, S.; DIXIT, S. N. Antifungal activity of leaf extract of some higher plants. *Acta Botanica Indica*, v. 7, p. 147-150, 1979.

MOHAMMADPOUR, H.; POURFATHOLLAH, A. A.; ZARIF, M. N.; TAHOORI, M. T. TNF- $\alpha$  modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *International Immunopharmacology*, v. 28, p. 1009-1017, 2015.

MONTENEGRO, M. R.; FECHIO, M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T.; BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. (Org.). Patologia: Processos gerais. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. cap. 7.

MONTGOMERY, S. L.; BOWERS, W. J. Tumor necrosis factor alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 7, n. 1, p. 42-59, 2012.

MORELAND, L. W.; SCHIFF, M. H.; BAUMGARTNER, S. W.; TINDALL, E.; FLEISCHMANN, R. M.; BULPITT, K. J.; WEAVER, A. L.; KEYSTONE, E. C.; FURST, D. E.; MEASE, P. J.; RUDERMAN, E. M.; HORWITZ, D. A.; ARKFELD, D. G.; GARRISON, L.; BURGE, D. J.; BLOSCH, C. M.; LANGE, M. L.; McDONNELL, N. D.; WEINBLATT, M. E. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, v.130, p. 478-486, 1999.

MORIKAWA, K.; NONAKA, M.; NARAHARA, M. *et al.* Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*, v. 74, n. 6, p. 709-721, 2003.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Inc. (Ed). Algonac, Michigan, USA, 2000.

MOURÃO, R. H. V.; SANTOS, F. O.; FRANZOTTI, E. M.; MORENO, M. P. N.; ANTONIOLLI, A. R. Antiinflammatory activity and acute toxicity (LD50) of the juice of *Kalanchoe brasiliensis* comb. leaves picked before and during blooming. *Phytotherapy Research*, v.1, p. 352-354, 1999.

MURPHY, P. G.; RAMER, M. S.; BORTHWICK, L.; GALDIE, J.; RICHARDSON, P. M.; BISBY, M. A. Endogenous interleukin-6 contributes to hypersensitivity to cutaneous stimuli and changes in neuropeptides associated with chronic nerve constriction in mice. *The European Journal of Neuroscience*, v. 11, p. 2243-2253, 1999.

MURRAY, J. J.; TONNEL, A. B.; BRASH, A. R.; ROBERTS, L. J. II; GOSSET, P.; WORKMAN, R.; CAPRON, A.; OATES, J. A. Release of prostaglandin D2 into human airways during acute antigen challenge. *The New England Journal of Medicine*, v. 315, p. 800-804, 1986.

MUZITANO, M. F.; BERGONIZ, M. C.; DE MELO, G. O.; LAGE, C. L. S.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Influence of cultivation

conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 132-137, 2011.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; ALMEIDA, A. P.; DA-SILVA, S. A. G.; KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica*, v. 72, p. 81-83, 2006.

NAIR, M. P.; MAHAJAN, S.; REYNOLDS, J. L. *et al.* The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- $\kappa$ B system. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 13, n. 3, p. 319-328, 2006.

NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA, S.; UENO, A.; KUDO, I.; OH-ISHI, S. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages, *Journal of Immunology*, v. 160, p. 2974-2982, 1998.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-885, 2002.

NASCIMENTO, L. B. S.; LEAL-COSTA, M. V.; COUTINHO, M. A. S.; MOREIRA, N. S.; LAGE, C. L. S.; BARBI, N. S.; COSTA, S. S.; TAVARES, E. S. Increased Antioxidant Activity and Changes in Phenolic Profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) Specimens Grown Under Supplemental Blue Light. *Photochemistry and Photobiology*, v. 89, p. 391-399, 2013.

NASCIMENTO, L. B. S.; MOREIRA, N. S.; LEAL-COSTA, M. V.; COSTA, S. S.; TAVARES, E. S. Induction of wound-periderm-like tissue in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.(Crassulaceae) leaves as a defence response to high UV-B radiation levels. *Annals of Botany*, v. 116, p. 763-769, 2015a.

NASCIMENTO, L. B.; LEAL-COSTA, M. V.; MENEZES, E. A.; LOPES, V. R.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; TAVARES, E. S. Ultraviolet-B radiation effects on phenolic profile and flavonoid content of *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 148, p. 73-81, 2015b.

NASRI, H.; SHIRZAD, H. Toxicity and safety of medicinal plants. *Journal of Herbal Medicine and Pharmacology*, v. 2, p. 21-22, 2013.

NAUSEEF, W. M. Myeloperoxidase in human neutrophil host defence. *Cellular Microbiology*, v. 16, n. 8, p. 1146-1155, 2014.

NAYAK, B. S.; MARSHALL JR, I. G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. Leaf - A preliminary study. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 48, p. 572-576, 2010.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. 2001. New York: Macgraw-Hill.

NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H-G.; SCHMIDT, R. F. Sensitization of articular afferents to mechanical stimuli by bradykinin. *Pflügers Archives*, v. 415, p. 330-335, 1989.

NEVE, J.; PARIJ, N.; MOGUILEVSKY, N. Inhibition of the myeloperoxidase chlorinating activity by non-steroidal anti-inflammatory drugs investigated with a human recombinant enzyme. *European Journal of Pharmacology*, v. 417, p. 37-43, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461, 2007.

NGUELEFACK, T. B.; NANA, P.; ATSAMO, A. D.; DIMO, T.; WATCHO, P.; DONGMO, A. B.; TAPONDJOU, L. A.; NJAMEN, D.; WANSI, S. L.; KAMANYI, A. Analgesic and anticonvulsivant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Hawort (Crassulaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 1, p. 70-75, 2006.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p. 418, 2001.

O'BYRNE, J. O.; DALGLEISH, A. G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *British Journal of Cancer*, v. 85, p. 473-483, 2001.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. *Journal of ethnopharmacology*, v. 99, n. 1, p. 13-19, 2005.

OKWU, D. E.; NNAMDI, F. U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. *Journal of Chemistry and Pharmacological Research*, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2011.

OKWU, E.; JOSIAH, C. Evaluation of the chemical composition of two Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 357-361, 2006.

OLIVEIRA, A. B. Espectrofotometria no controle de qualidade de fitoterápicos da *Schinus terebinthifolius raddi*: uso de marcadores. 2001. Dissertação – Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. São Luís.

O'SHEA, J. J.; GADINA, M.; KANNO, Y. Cytokine Signaling: Birth of a Pathway. *Journal of Immunology*, v. 187, n. 11, p. 5475-5478, 2011.

PAL, R. S.; ARIHARASIVAKUMAR, G.; GIRHEPUNJHE, K.; UPUDHAY, A. *In vitro* antioxidative activity of phenolic and flavonoids compounds extracted from seeds of *Abrus precatorius*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 1, p. 136-140, 2009.

PAL, S.; CHAUDHURI, A. K. N. Anti-inflammatory action of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract. *Fitoterapia*, v. 6, p. 527-533, 1990.

PAL, S.; CHAUDHURI, A. K. N. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 33, p. 97-102, 1991.

PAL, S.; SEN, T.; CHAUDHARI, A. K. N. Neuropsychopharmacological profile of the methanolic fraction of *Bryophyllum pinnatum* leaf extract. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 51, p. 313-318, 1999.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- $\alpha$  therapies: the next generation. *Natural Reviews Drug Discovery*, London, v. 2, p. 736-746, 2003.

PANDEY, K. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Pariheniumhisterophorus*: an *in vitro* study. *National Academy Science Letters*, v. 30, n. 11-12, p. 383-386, 2007.

PANOSSIAN, A.; HAMM, R.; KADIOGLU, O.; WIKMAN, G.; EFFERTH, T. Synergy and Antagonism of Active Constituents of ADAPT-232 on Transcriptional Level of Metabolic Regulation of Isolated Neuroglial Cells. *Frontiers in Neuroscience*, v. 7, n. 16, 2013.

PAPICH, M. G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 38, p. 1243-1266, 2008.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M. K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y. H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-*O*-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, v. 127, n. 8, p. 1275-1279, 2007.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Antiinflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.

PAYNE, R. Limitations of NSAIDs for pain management: toxicity or lack of efficacy? *The Journal of Pain*, v. 1, p. 14-18, 2000.

PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A.; THIRION, S.; TROADEC, J. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. *Physiology Behavior*, v. 97, p. 279-292, 2009.

PENNICA, D.; HAYFLICK, J. S.; BRINGMAN, T. S.; PALLADINO, M. A.; GOEDDEL, D. V. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 82, n. 18, p. 6060-6064, 1985.

PERL, E. R. Myelinated afferent fibres innervating the primate skin and their response to noxious stimuli. *The Journal of Physiology*, v. 197, p. 593-615, 1968.

PERL, E. R. Function of dorsal root ganglion neurons: an overview. In: Scott, S.A.(Ed.), *Sensory Neurons: Diversity, Development and Plasticity*. Oxford University Press, New York, p. 3-23, 1992.

PHATAK, R. S.; HENDRE, A. S. *In-vitro* Antiurolithiatic Activity of *Kalanchoe pinnata* Extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phtytochemical Research*, v.7, n. 2, p. 275-279, 2015.

PIXABAY. <http://pixabay.com/pt/planta-de-goethe-flor-269758>.

PLANGGER, N.; RIST, L.; ZIMMERMANN, R.; MANDACH, U. V. Intravenous tocolysis with *Bryophyllum pinnatum* is better tolerated than beta-agonist application. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 124, p. 168-172, 2006.

PORTER, D. G. Ethical scores for animal experiments. *Nature*, v. 356, n. 6365, p.101-102, 1992.

PRASAD, A. K.; KUMAR, S.; IYER, S. V.; SUDANI, R. J.; VAIDYA, S. K. Pharmacognostical, phytochemical and pharmacological review on *Bryophyllum pinnata*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, v. 3, p. 423-433, 2012.

QUAZI MAJAZ, A.; TATIYA, A. U.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; SIRAJ, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, v. 2, p. 1478-1482, 2011a.

QUAZI MAJAZ, A.; NAZIM, S.; ASIR, Q.; SHOEB, Q.; BILIAL, G. M. Screening of *in vitro* antihelminthic activity of *Kalanchoe pinnata* roots. *International Journal of Ayurveda Research Pharmacology*, v. 2, n. 1, p. 221-223, 2011b.

RAHMATI, M.; MOBASHERI, A.; MOZAFARI, M. Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*, v. 85, p. 81-90, 2016.

RAMESOVÁ, S.; SOKOLOVÁ, R.; DEGANO, I.; BULÍCKOVÁ, J.; ZABKA, J.; GÁL, M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 402, p. 975-982, 2012.

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

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Elmsford, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATHER, L. J. Disturbance of function (*functio laesa*): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galento the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, v. 47, n. 3. p. 303-322, 1971.

REARDON, D. P.; ANGER, K. E.; SZUMITA, P. M. Pathophysiology, assessment, and management of pain in critically ill adults. *American Journal of Health System Pharmacy*, v. 72, p. 1531-1543, 2015.



RENISUS – Ministério da Saúde. Fevereiro de 2009.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *Journal Comparative Neurology*, v. 96, n. 3, p. 414-495, 1952.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 31, p. 986-1000, 2011.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BROAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

ROBAK, T.; GLADALSKA, A.; STEPIEN, H. The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *European Cytokine Network*, v. 9, n. 2, p. 145-154, 1998.

ROBERTS, L. J. II; SWEETMAN, B. J. LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F.; OATES, J. A. Increased production of prostaglandin D2 in patients with systemic mastocytosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 303, p. 1400-1404, 1980.

ROBBINS; COTRAN. Patologia: Bases patológicas das doenças. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI, C.; DA SILVA, E. V.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Antiinflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Research*, v. 56, n. 10, p. 402-408, 2007.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunologia. 5 ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

ROSEN, H.; MICHEL B. Redundant contribution of myeloperoxidase dependent systems to neutrophil-mediated killing of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, v. 65, p. 4173-4178, 1997.

ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S.; MORAES, V. L. G. Brazilian medicinal plants: a rich source of immunomodulatory substances. *Ciência e Cultura*, v. 49, p. 395-401, 1997.

ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S.; BORGES, M. B. S., DA SILVA, S. A. G.; NOLETO, G. R.; SOUZA, M. L. M.; MORAES, V. L. G. Immunosuppressive effect of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* in mice. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 399-402, 1994.

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

RUEFF, A.; DRAY, A. Sensitization of peripheral afferent fibres in the in vitro neonatal rat spinal cord by bradykinin and prostaglandins. *Neuroscience*, v. 54, p. 527-535, 1993.

SALAHDEEN, H. M.; YEMITAN, O. Neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Brophyllum pinnatum* in mice. *African Journal of Biomedical Research*, v. 9, p. 101-107, 2006.

SALEH, T. S. F, CALIXTO, J. B, MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. *Peptides*, v. 20, n. 8, p. 949-956, 1999.

SANTOS, A.L. Avaliação das ações analgésica e antiinflamatória das frações purificadas de duas espécies comuns de Tanchagem: *Plantago major* L e *Plantago lanceolata* L. 1998. Dissertação. São Paulo.

SANZ, M.J.; KUBES, P. Neutrophil-active chemokines in *in vivo* imaging of neutrophil trafficking. *European Journal of Immunology*, v. 42, p. 278-283, 2012.

SCHACHNA, L. The anti- TNF revolution in ankylosing spondylitis. *Medical Journal of Australia*, Sydney, v. 181, n. 10, p. 529-530, 2004.

SHAGHAGHI, M.; MANZOORI, J. L.; AFSHAR, D. J.; JOUYBAN, A. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using Terbium sensitized fluorescence method. *DARU*, v. 17, p. 264-268, 2009.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. *Journal of Neurophysiology*, v. 60, n. 6, p. 2180-2195, 1988.

SCHULER, V.; SUTERA, K.; FÜRERA, K.; EBERLI, D.; HORST, M.; BETSCHAT, C.; BRENNISEN, R.; HAMGURGER, M.; MENNET, M.; SCHNELLE, M.; SIMÕES-WÜST, A. P.; VON MANDACH, U. *Bryophyllum pinnatum* inhibits detrusor contractility in porcine bladder strips - A pharmacological study towards a new treatment option of overactive bladder. *Phytomedicine*, v. 19, p. 947-951, 2012.

SCHULTZ, J.; KAMINKER, K. Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 96, p. 465-467, 1962.

SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. *Journal of Herbal Medicine and Pharmacology*, v. 3, p. 1-3, 2014.

SGARBI, M. W. M; SILVA JUNIOR, B. A.; NETO, H.; SOARES, J. The importance of systemic inflammatory response (SIRS) in the prognosis of polytraumatized patients. *Revista Brasileira de Ortopedia*, v. 41, n. 2, p. 1-6, 2006.

SHAIK, Y. B.; CASTELLANI, M. L.; PERRELLA, A. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic agents*, v. 20, p. 47-52, 2006.

SHARMA, N. K.; PRIYANKA, K. K. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of *Kalanchoe spanthulata* Leaves Extract. *Journal of Advanced Scientific Research*, v. 2, n. 4, p. 71-73, 2011.

SHEERAN, P.; HALL, G. M. Cytokines in anaesthesia. *British Journal of Anaesthesia*, v. 78, p. 201-219, 1997.

SHUKLA, A. B.; MANDAVIA, D. R.; BARVALIYA, M. J.; BAXI, S. N.; THIPATHI, C. R. Evaluation of anti-urolithiatic effect of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*(Lam.) leaves using ethylene glycol-induced renal calculi. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 4, n. 3, p. 151-159, 2014.

SIDDIQUI, S.; FAIZI, S.; SIDDIQUI, B. S.; SULTANA, N. Triterpenoids and phenanthrenes from leaves of *Bryophyllum Pinnatum*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 2433-2438, 1989.

SIMÃO DA SILVA, K. A. B.; PASZCZUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, F. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene  $\alpha,\beta$ -amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistente pain in mice. *Pain*, v. 152, p. 1872-1887, 2011.

SMITH, W. L.; DeWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, p. 145-182, 2000.

SOARES, D. M.; MACHADO, R. R.; YAMASHIRO, L. H.; MELO, M. C. C.; SOUZA, G. E. P. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-1 induces fever by a prostaglandin-dependent mechanism in rats. *Brain Research*, v. 1233, p. 79-88, 2008.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The principles and Practice of Statistics. New York: W. H. Freeman, 1981. p. 859.

SOUSA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M.; ALVES, L. A.; CARVALHO, J. C. T. Estudo preliminar da atividade anti-inflamatória de *Bryophyllum calycinum* Salisb. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 1, p. 60-64, 2005.

SPENCER, J. P. E.; VANZOUR, D.; RENDEIRO, C. Flavonoids and cognition: The molecular mechanisms underlying their behavioural effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 492, p. 1-9, 2009.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária. 2011. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

STEAGALL, P. V. M.; MOUTINHO, F. Q.; MATOVANI, F. B.; PASSARELLI, D.; THOMASSIAN, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. *Research in Veterinary Science*, v. 86, p. 115-120, 2009.

STENKEN, J. A.; POSCHENRIEDER, A. J. Bioanalytical chemistry of cytokines: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 853, p. 95-115, 2015.

SUMNER, J. The natural history of medicinal plants. Portland: Timber Press. 2000. 235p.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontiana* × *tubiflora*. *Phytochemistry*, v. 58, p. 311-314, 2001a.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 65, p. 947-949, 2001b.

SUTTON, S.; CLUTTERBUCK, A.; HARRIS, P.; GENT, T.; FREEMAN, S. FOSTER, N.; BARRET-JOLLEY, R.; MOBASHERI, A. The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, v. 179, p. 10-24, 2009.

TAIWO, O.; LEVINE, J. D. Prostaglandin effects after elimination of indirect hyperalgesic mechanisms in the skin of the rat. *Brain Research*, v. 492, p. 397-399, 1989.

TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M.; YAMAKI, K. Structure activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E2 production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids. *Phytomedicine*, v. 13, n. 5, p. 310-317, 2006.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v. 7, p. 1089-1099, 2008.

TARTAGLIA, L. A.; WEBER, R. F.; FIGARI, I. S.; REYNOLDS, C.; PALLADINO, M. A. JR, GOEDDEL, D. V. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 88, p. 9292-9296, 1991.

THOMPSON, S. W. N.; DRAY, A.; URBAN, L. Injury-induced plasticity of spinal reflex activity: NK1 neurokinin receptor activation and enhanced A- and C-fiber mediated responses in the rat spinal cord in vitro. *Journal of Neuroscience*, v. 14, p. 3672-3687, 1994.

TILLEY, S. L.; COFFMAN, T. M.; KOLLER, B. H. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 108, p. 15-23, 2001.

TORRES-SANTOS, E. C.; DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; SANTOS, A. P. P. T.; ALMEIDA, A. P.; ROSSI-BERGMAN, B. Toxicological Analysis and Effectiveness of Oral *Kalanchoe pinnata* on a Human Case of Cutaneous Leishmaniasis. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 801-803, 2003.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review Medicine, Palo Alto*, v. 45, p. 491-503, 1994.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ, R. Larvicides and acetyl-cholinesterase inhibitors from *Kalanchoe* species. *Quimica Nova*, v. 29, p. 415-418, 2006.

TUBARO, A.; DRI, P.; MELATO, M.; MULAS, G.; BIANCHI, P.; DEL NEGRO, P.; DELLA LOGGIA, R. In the croton oil ear test the effects of non steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) are dependent on the dose of the irritant. *Agents Actions*, v. 19, p. 371-373, 1986.

TURK, D. C.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. In: D. C. Turk & R. Melzack (eds) *Handbook of Pain assessment*. 1992. Nova York, Guilford, p. 3-12.

TYLER, V.E. Herbal medicine: from the past to the future. *Public Health Nutrition*, Wallingford, v. 3, n. 4A, p. 447-452, 2000.

VACHER, P. J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *Medicina Experimentalis*, v. 11, p. 51-58, 1964.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. 1997. *Medical Plants of South Africa*, 1st ed. Briza publications, Pretoria.

VANE, J. R. Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. *Nature: New Biology*, v. 231, p. 232-235, 1971.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 38, p. 97-120, 1998.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. *Eurogastroenterology and Motility*, v. 20, p. 73-80, 2008.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*, Dordrecht, v. 9, p. 323-343, 2000.

VERRI JR, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, F. Q. C.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology and Therapeutics*, v. 112, p. 116-138, 2006.

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

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; VOELKER, F. A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Federation Proceedings*, v. 41, p. 2588-2595, 1982.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Quantitative studies of the pathway to acute carrageenin inflammation. *Federation Proceedings*, n. 35, p. 2447-2454, 1976.

WAAGE, A.; HALSTENSEN, A.; ESPEVIK, T. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*, v. 1, n. 8529, p. 355-357, 1987.

WALDMANN, R.; BASSILANA, F.; DE WEIL, J.; CHAMPIGNY, G.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na channel specific for sensory neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 20975-20978, 1997b.

WALDMANN, R.; CHAMPIGNY, G.; BASSILANA, F.; HEURTEAUX, C.; LAZDUNSKI, M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*, v. 386, p. 173-177, 1997a.

WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. *Journal of Physiology*, v. 188, n. 3, p. 403-423, 1967.

WALTERS, E.T. Injury-related behavior and neuronal plasticity: An evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia and analgesia. *Intentional Review of Neurobiology*, v. 36, p. 325-427, 1994.

WALTERS, E.T. A Functional, Cellular, and Evolutionary Model of Nociceptive Plasticity in *Aplysia*. *Biological Bulletin*, v. 180, n. 2, p. 241-251, 1991.

WANG, J.; AL-LAMKI, R. S.; ZHANG, H.; KIRKILES-SMITH, N.; GAETA, M. L.; THIRU, S.; POBER, J. S.; BRADLEY, J. R. Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signalling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 24, p. 21751-21760, 2003.

WANG, Q. S.; YANG, L.; CUI, W. Y.; CHEN, L.; JIANG, Y. H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanol extract from aerial part of *Phlomis younghusbandii* Mukerjee. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 2014.

WHICHER, J. T.; EVANS, S. W. Cytokines in disease. *Clinical Chemistry*, v. 36, n. 7, p. 1269-1281, 1990.

WILLIAMS, A. C. C. *et al.* Evaluation of a cognitive behavioural programme for rehabilitating patients with chronic pain. *British Journal of General Practice*, v. 43, p. 513-518, 1993.

WILLINGALE, H. L.; GARDINER, N. J.; McLYMONT, N.; GIBLET, S.; GRUBB, B. D. Prostanoids synthesized by cyclo-oxygenase isoforms in rat spinal cord and their contribution to the development of neuronal hyperexcitability. *British Journal of Pharmacology*, v. 122, p. 1593-1604, 1997.

WILLIS, W. D.; COGGESHALL, R.E. Sensory mechanisms of the spinal cord. 1991. New York: Plenum Press.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future of chronic inflammatory disease. *Lancet*, v. 355, p. 646-648, 2000.

WOJDASIEWICZ, P.; PONIATOWSKI, L. A.; SZUKIEWICZ, D. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of osteoarthritis. *Mediators of Inflammation*, v. 2014, p. 1-19, 2014.

WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. *Seminars in Immunology*, v. 15, p. 5-14, 2003.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumor necrosis factor alpha. *British Journal Pharmacology*, v. 121, p. 417-424, 1997.

WOOLF, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

WRIGHT, A. Recent concepts in the neurophysiology of pain. *Manual Therapy*, v. 4, p. 196-202, 1999.

WU, A. J.; JUA, H.; MUNSON, S. H.; McDEVITT, H. O. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell levels in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, v. 99, p. 12287-12292, 2002.

YADAV, N. P.; DIXIT, V. K. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 86, p. 197-202, 2003.

YAMADA, C. S. B. Fitoterapia: sua história e importância. *Revista Racine*, São Paulo, v. 43, p. 50-51, 1998.

YAMAGISHI, T.; HARUNA, M.; YAN X-Z; CHANG, J. J.; LEE, K. H. Antitumor Agents, 110. *Bryophyllin B*, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 1071-1079, 1989.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; *Quim. Nova* 2001, 24, 147.

XU, X.; HAO, J.; ANDELL-SONSSON, S.; POLI, V.; BARTFAI, T.; WIESENFELD-HALLIN, Z. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. *Cytokine*, v. 9, p. 1028-1033, 1997.

XUE, Q.; LU, Y.; EISELE, M. R.; SULISTIJO, E.; FAN, R.; MILLER-JENSEN, K. Analysis of single-cell secretion reveals a role for paracrine signaling in coordinating macrophage response to TLR4 stimulation. *Science Signaling*, v. 8, n. 381, p. 1-12, 2015.

YUAN, C.; SIDHU, R. S.; KUKLEV, D. V.; KADO, Y.; WADA, M.; SONG, I.; SMITH, W. L. Cyclooxygenase allosterism, fatty acid-mediated cross-talk between

monomers of cyclooxygenase homodimers. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 10046-10055, 2009.

ZANINI JUNIOR, J. C.; MEDEIROS, Y. S.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Actions of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear edema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Phytotherapy Research*, v. 6, p. 1-5, 1992.

ZAKARIA, Z. A.; GOPALAN, H. K.; ZAINAL, H.; MOHD POJAN, N. H.; MORSID, N. A.; ARIS, A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* chloroform extract in animal models. *Yakugaku Zasshi*, v. 126, n. 11, p. 1171-1178, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement*, v. 554, p. 221-233, 1986.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ZUURBIER, K. W.; VAN DEN BERG, J. D.; VAN GELDER, B. F.; MUIJSERS, A. O. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. *European Journal of Biochemistry*, v. 205, p. 737-742, 1992.



## Research Article

# Mechanisms Underlying the Antinociceptive, Antiedematogenic, and Anti-Inflammatory Activity of the Main Flavonoid from *Kalanchoe pinnata*

Raquel Teixeira Ferreira,<sup>1</sup> Marcela Araújo Soares Coutinho,<sup>2</sup>  
David do Carmo Malvar,<sup>1</sup> Elson Alves Costa,<sup>3</sup> Iziara Ferreira Florentino,<sup>3</sup>  
Sônia Soares Costa,<sup>2</sup> and Frederico Argollo Vanderlinde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacology, Department of Physiological Sciences, Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465, Km 07, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

<sup>2</sup>Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho 373, 21941-902 Cidade Universitária, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Fisiológicas, 74001-970 Goiânia, GO, Brazil

Correspondence should be addressed to Frederico Argollo Vanderlinde; favanderlinde@gmail.com

Received 30 July 2014; Revised 2 November 2014; Accepted 6 November 2014; Published 11 December 2014

Academic Editor: Jae Youl Cho

Copyright © 2014 Raquel Teixeira Ferreira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Kalanchoe pinnata* (KP) is popularly used for treating inflammatory diseases. This study investigated the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory potential of the subcutaneous administration of KP flower aqueous extract (KPFE), its ethyl acetate (EtOAcF) and butanol (BuOHF) fractions, and the main KP flavonoid [quercetin 3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside] (KPFV) in mice, as well as its possible mechanisms of action. KPFE (30–300 mg/kg) and KPFV (1–10 mg/kg) inhibited the acetic acid-induced writhing (ID<sub>50</sub> = 164.8 and 9.4 mg/kg, resp.). KPFE (300 mg/kg), EtOAcF (12 mg/kg), BuOHF (15 mg/kg), or KPFV (0.3–3.0 mg/kg) reduced leukocyte migration on carrageenan-induced pleurisy (ID<sub>50</sub> = 2.0 mg/kg for KPFV). KPFE (3–30 mg/kg) and KPFV (0.3–3.0 mg/kg) reduced the croton oil-induced ear edema (ID<sub>50</sub> = 4.3 and 0.76 mg/kg, resp.). KPFE and KPFV reduced the TNF- $\alpha$  concentration in the pleural exudates on carrageenan-induced pleurisy test. Moreover, KPFV inhibited COX-1 (IC<sub>50</sub> = 22.1  $\mu$ g/mL) and COX-2 (IC<sub>50</sub> > 50  $\mu$ g/mL). The selectivity index (COX-1<sub>IC<sub>50</sub></sub>/COX-2<sub>IC<sub>50</sub></sub>) was <0.44. These results indicate that KPFE and KPFV produced antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activities through COX inhibition and TNF- $\alpha$  reduction, revealing that the main flavonoid in KP flowers and leaves plays an important role in the ethnomedicinal use of the plant.

## 1. Introduction

*Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (= *Bryophyllum pinnatum*), one of the most important medicinal species of the family Crassulaceae, is used in folk medicine to treatment of many diseases such as cardiovascular dysfunctions [1] and diabetes [2] and for healing wounds and treating inflammations [3, 4]. The leaves from this plant are the part most commonly used and therefore have been the focus of a variety of chemical and pharmacological studies. Several studies have reported antiviral, antimicrobial, antiulcer, antileishmanial,

hepatoprotective, antioxidant, and antihyperglycemic activities from leaves of *K. pinnata* [1, 2, 5]; to review see [4]. Recent studies have shown the potential activity of KP leaves in inhibiting inflammatory events related to allergic airway diseases [6]. Anti-inflammatory activity has also been reported for KP leaves [7–9]. Polyphenolic compounds present in the extract are speculated to be responsible for this activity. Although many studies have been carried out with KP leaves, there are few works devoted to the flowers of this species [3].

Recently we demonstrated the immunosuppressive potential of the aqueous extract from KP flowers. The KPFE

proved to be more active than the aqueous leaf extract in inhibiting murine T-cell mitogenesis *in vitro*. In addition, five quercetin-derivative flavonoids isolated from the flower extract showed potent inhibitory activity against murine T-cell mitogenesis as well as on IL-2 and IL-4 production, without cell toxicity [10]. Flavonoids are the main phenolic compounds in the *Kalanchoe* species [3] and are of great pharmacological importance [11]. Some studies have demonstrated a direct relation between the anti-inflammatory effects of various flavonoids and cyclooxygenases 1 and 2 [12], leading to a reduction of important anti-inflammatory mediators such as prostaglandin E<sub>2</sub> [13]. Additionally, other studies have revealed the efficacy of flavonoids in the reduction of TNF- $\alpha$  levels [14–16] through the ability to reduce the expression of some genes linked with proinflammatory events [14] and the circulating levels of TNF- $\alpha$  in humans [16].

Considering the promising preliminary results with KP flowers and the relevant therapeutic potential of this species, the aim of this study was to investigate the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activities of the KP flowers aqueous extract, the two enriched-flavonoid fractions, and the main KPF flavonoid [quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside] (here denominated as KPFV) on pharmacological inflammation models.

## 2. Material and Methods

**2.1. Plant Material.** Flowers of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon were collected from specimens cultivated in the UFRJ campus, Brazil, in September 2011, and identified by the botanist M. F. Freitas at the herbarium of the Rio de Janeiro Botanical Garden. A voucher specimen (292.697) is deposited at the Herbarium of the Rio de Janeiro Botanical Garden (Brazil).

**2.2. Extraction and Isolation.** Fresh flowers (2.52 kg) were ground and extracted with distilled water at 20% w/v for 30 min at 50°C. The yield of lyophilized flower extract (KPF) was 3.82% (90.2 g) from the initial fresh material. Dried flower extract was resuspended in distilled water (2.1 L) and precipitated with EtOH (1:1). The soluble fraction (76.9 g) was partitioned with ethyl acetate (1  $\times$  550 mL; 2  $\times$  225 mL), affording EtOAcF (5.58 g; 6.2%, wt/wt of dried KPF extract). The residual soluble fraction (71.38 g) was then partitioned with *n*-butanol (1  $\times$  550 mL; 2  $\times$  225 mL), affording BuOHF (12.35 g; 13.7%, wt/wt of dried KPF extract). The flavonoid quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (KPFV) was isolated (95% purity; retention time 31.2 minutes) according to procedures previously reported [10].

HPLC chromatograms of *Kalanchoe pinnata* flowers extract, organic fractions, and isolated flavonoid [quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside] (KPFV), along with <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectra of the flavonoid, are available online in Supplementary Material (at <http://dx.doi.org/10.1155/2014/429256>).

**2.3. Drugs.** The drugs used were dexamethasone (Decadron, Aché Lab. Farm, São Paulo, Brazil), carrageenan, indomethacin, croton oil (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), and acetone (Merck AG, Darmstadt, Germany), acetic acid, and PBS solution. The lyophilized KP flower extract (KPF), the butanol (BuOHF) and ethyl acetate (EtOAcF) KP fractions, the flavonoid [quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside] (KPFV), and the drugs were diluted in saline 0.9% in such a concentration so as to allow the administration of 10 mL/kg, by subcutaneous (s.c.) route, for each dose employed. EtOAcF, BuOHF, and KPFV doses were determined according to their yields from KPF.

**2.4. Animals.** The experimental protocols in the pharmacological assays using adult male Swiss mice (25–35 g) were approved by the local Animal Care and Use Committee (3403/2011/COMEP/UFRRJ).

**2.5. Acetic Acid-Induced Abdominal Writhing.** Groups of mice ( $n = 5-6$ ) were treated subcutaneously with saline, KPF (30, 100, and 300 mg/kg), KPFV (1, 3, and 10 mg/kg), or the positive control indomethacin (10 mg/kg) 30 min before acetic acid injection (1.2%, 0.1 mL/10 g) and the number of writhings was counted for the following 30 min [17]. The results were expressed as means  $\pm$  SEM of number of writhings allowing the ID<sub>50</sub> value calculation.

**2.6. Carrageenan-Induced Pleurisy.** Groups of mice ( $n = 8$ ) were treated subcutaneously with saline, KPF (300 mg/kg), KP fractions (BuOHF = 15 mg/kg; EtOAcF = 12 mg/kg), KPFV (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg), or dexamethasone (2 mg/kg) 30 min prior to an injection of carrageenan (1% in saline) into the pleural cavity. After four hours the pleural exudate was collected with 1 mL of heparinized PBS and the total number of leukocytes was counted in a Neubauer chamber [18].

**2.7. Croton Oil-Induced Mice Ear Edema.** Groups of mice ( $n = 8-11$ ) were treated subcutaneously with saline, KPF (3, 10, and 30 mg/kg), KPFV (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg), or dexamethasone (2 mg/kg) 30 min before application of croton oil (2.5% in acetone, 20  $\mu$ L) on the inner surface of the right ear. The weight difference ( $\Delta$ ) between the right ears (croton oil, 2.5%) and left ears (acetone) was measured four hours after croton oil application [18].

### 2.8. Evaluation of Action Mechanisms

**2.8.1. TNF- $\alpha$  Ex Vivo Measurement.** Groups of mice ( $n = 8$ ) were treated subcutaneously with saline, KPF (300 mg/kg), KPFV (3 mg/kg), or dexamethasone (2 mg/kg) 30 min prior to carrageenan injection (1% in saline; 500  $\mu$ L/mouse) into the pleural cavity. Four hours after carrageenan administration, the pleural exudate was collected with 1 mL of heparinized PBS. An aliquot was used to evaluate TNF- $\alpha$  concentrations in pleural exudate through an immunosorbent assay kit (ELISA) (Ebioscience, San Diego, CA, USA). Results were expressed as means  $\pm$  SEM of TNF- $\alpha$  concentration (pg/mL) [19].

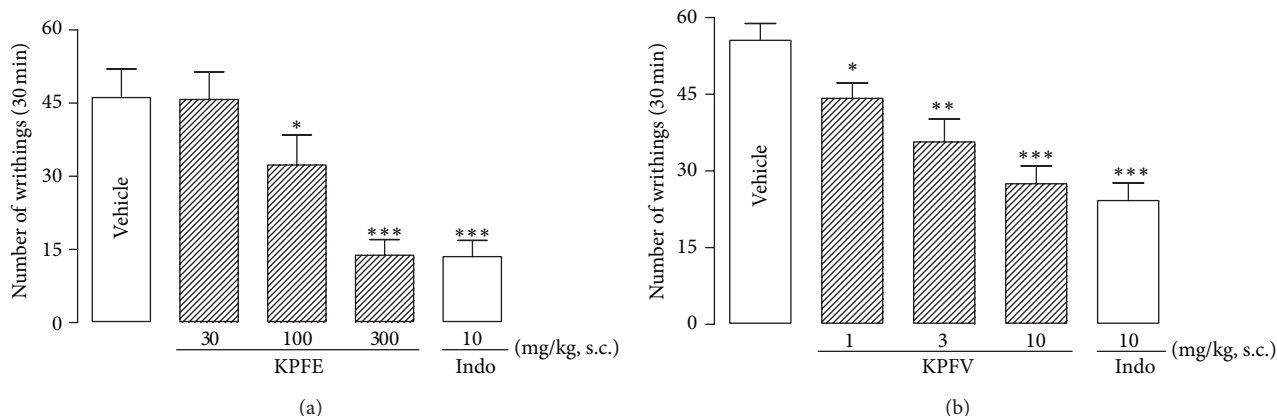


FIGURE 1: Effect of KPFE (a) and KPFV (b) on the acetic acid-induced abdominal writhing test. KPFE, KPFV, or indomethacin (Indo) was subcutaneously administered 30 min before acetic acid injection (1.2%, 0.1 mL/10 g). The number of acetic acid-induced abdominal writhings was counted for the following 30 min. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from the vehicle-treated group. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 5-6 mice.

**2.8.2. In Vitro Cyclooxygenase (COX) Inhibition Assay.** The inhibitory effect of KPFV and the positive control indomethacin on COX-1/COX-2 enzymatic activity were determined using a colorimetric COX (ovine) inhibitor screening assay kit (Cayman Chemical, Catalogue number 760111) according to the protocol recommended by the supplier [19]. The range of KPFV concentrations used for evaluation of both COX activities was from 3.125 to 50  $\mu\text{g/mL}$ , while the ranges of indomethacin concentration were from 2.5 to 80  $\mu\text{g/mL}$  and from 18.75 to 600  $\mu\text{g/mL}$  for COX-1 and COX-2 activity, respectively.

**2.9. Statistical Analysis.** Data were statistically analyzed with *GraphPad Prism 5*, and the results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences among the groups were calculated using one-way ANOVA followed by *Tukey-Kramer test*, and test data were considered different at a significance level of  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Purification of aqueous extract from KP flowers (KPFE) afforded two enriched-flavonoid fractions: EtOAcF (6.2%) and BuOHF (13.7%).

Pretreatment (s.c.) of mice with KPFE at 100 and 300 mg/kg produced antinociception evidenced by the reduction of the number of acetic acid-induced writhings (w) by 30.1% ( $32.3 \pm 6.2$  w) and 70.1% ( $13.8 \pm 3.2$  w), respectively ( $\text{ID}_{50}$  164.8 mg/kg), comparatively with vehicle group ( $46.2 \pm 5.8$  w), while the positive control indomethacin (10 mg/kg) reduced by 70.8% ( $13.5 \pm 3.4$  w) and KPFE (30 mg/kg) was ineffective (Figure 1(a)).

The main flavonoid KPFV (1, 3, and 10 mg/kg) also produced a dose-related inhibition of the number of acetic acid-induced writhing by 20.5% ( $44.2 \pm 3.1$  w), 35.8% ( $35.7 \pm 4.5$  w), and 50.5% ( $27.5 \pm 3.5$  w), respectively ( $\text{ID}_{50}$  9.4 mg/kg), when compared with vehicle group ( $55.6 \pm 3.3$  w). As expected, the positive control indomethacin (10 mg/kg)

reduced the number of writhings by 56.5% ( $24.2 \pm 3.5$  w) (Figure 1(b)).

In the carrageenan-induced pleurisy assay the pretreatment (s.c.) with KPFE (300 mg/kg), EtOAcF (12 mg/kg), BuOHF (15 mg/kg), or dexamethasone (positive control group—2 mg/kg) reduced the leukocyte migration into the pleural cavity by 56.1% ( $2.5 \pm 0.2$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 47.3% ( $3.0 \pm 0.3$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 39.6% ( $3.4 \pm 0.3$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), and 43.9% ( $3.2 \pm 0.6$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), respectively, when compared to the vehicle-treated group ( $5.7 \pm 0.7$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ) (Figure 2(a)).

KPFV (0.3, 1.0, and 3.0 mg/kg) also exhibited a dose-related reduction of leukocyte migration by 8.0% ( $6.9 \pm 0.6$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), 38.8% ( $4.6 \pm 0.2$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), and 57.2% ( $3.2 \pm 0.3$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ), respectively ( $\text{ID}_{50}$  2.0 mg/kg), whereas the treated with dexamethasone (2 mg/kg), positive control group, inhibited by 71.9% ( $2.1 \pm 0.2$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ) when compared with the vehicle-treated group ( $7.5 \pm 0.6$  leukocytes  $\times 10^6/\text{mL}$ ) (Figure 2(b)).

KPFE (3, 10, or 30 mg/kg, s.c.) produced a dose-related antiedematogenic effect evidenced by the reduction in croton oil-induced mice ear edema by 50.8% ( $\Delta = 2.9 \pm 0.5$  mg), 54.2% ( $\Delta = 2.7 \pm 0.7$  mg), and 64.4% ( $\Delta = 2.1 \pm 0.5$  mg), respectively, whereas dexamethasone (2 mg/kg) reduced the edema by 81.4% ( $\Delta = 1.1 \pm 0.3$  mg) when compared with the vehicle treated group ( $\Delta = 5.9 \pm 1.0$  mg), with  $\text{ID}_{50}$  4.3 mg/kg (Figure 3(a)).

In another experimental set, pretreatment with the main flavonoid KPFV (0.3, 1.0, or 3.0 mg/kg, s.c.) also produced a dose-related antiedematogenic effect in the croton oil-induced mice ear edema by 38.2% ( $\Delta = 4.2 \pm 0.4$  mg), 54.4% ( $\Delta = 3.1 \pm 0.4$  mg), and 70.6% ( $\Delta = 2.0 \pm 0.4$  mg), respectively, whereas the treatment with dexamethasone (2 mg/kg) reduced the ear edema by 85.3% ( $\Delta = 1.0 \pm 0.4$  mg) when compared with the vehicle group ( $\Delta = 6.8 \pm 0.6$  mg), with  $\text{ID}_{50}$  0.76 mg/kg (Figure 3(b)).

After intrapleural injection of carrageenan, the pretreatment with KPFE (300 mg/kg, s.c.) or dexamethasone

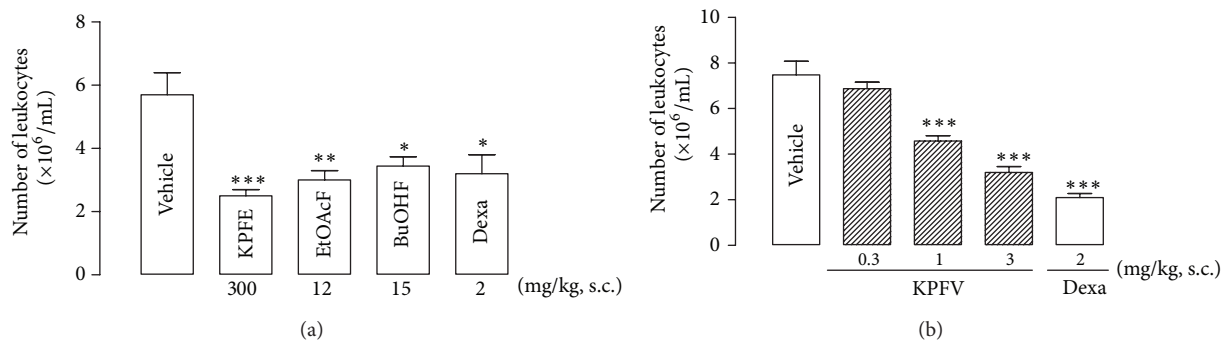


FIGURE 2: Effect of KPFE, KP fractions (a) and KPFV (b) in the carrageenan-induced pleurisy. KPFE, KP fractions (EtOAcF and BuOHF), KPFV, or dexamethasone (Dexa) was subcutaneously administrated 30 min before carrageenan injection (1%, 0.1 mL/10 g). After four hours, the pleural exudate was collected and the total number of leukocytes was counted in a Neubauer chamber. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from the vehicle-treated group. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 8 mice.

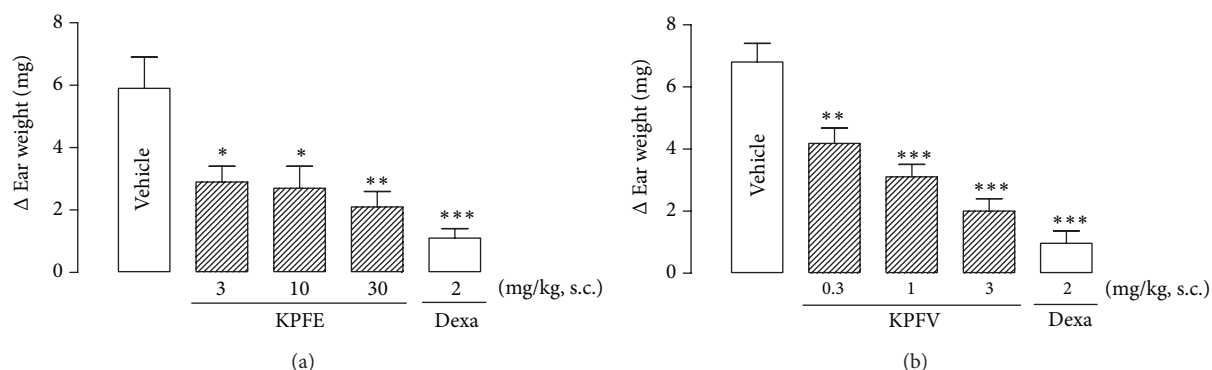


FIGURE 3: Effect of KPFE (a) and KPFV (b) on the croton oil-induced mice ear edema. KPFE, KPFV, or dexamethasone (Dexa) was subcutaneously administrated 30 min before application of croton oil (2.5% in acetone, 20  $\mu\text{L}$ ) or acetone on the inner surface of the right and left ear, respectively. After four hours, the weight difference ( $\Delta$ ) between the right and left ears was measured. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from the vehicle-treated group. Values represent the mean  $\pm$  SEM of 10 mice.

(2 mg/kg, s.c.) reduced the TNF- $\alpha$  concentration in pleural exudates ( $P < 0.001$ ) by 44.7% ( $47.6 \pm 0.3 \text{ pg/mL}$ ) and 69.8% ( $26.0 \pm 2.0 \text{ pg/mL}$ ), respectively, when compared to the vehicle group ( $86.0 \pm 2.0 \text{ pg/mL}$ ) (Figure 4(a)).

In an additional experiment, the flavonoid KPFV (3.0 mg/kg, s.c.) decreased the TNF- $\alpha$  concentration in pleural exudates by 66.6% ( $22.6 \pm 3.1 \text{ pg/mL}$ ) when compared to the vehicle group ( $67.5 \pm 4.9 \text{ pg/mL}$ ). As expected, dexamethasone (2 mg/kg, s.c.) also reduced the TNF- $\alpha$  concentration by 74.5% ( $17.2 \pm 3.2 \text{ pg/mL}$ ) (Figure 4(b)).

The flavonoid KPFV inhibited both COX-1 and COX-2 *in vitro* activities (Table 1), and the  $\text{IC}_{50}$  calculated for COX-1 inhibition was  $3.8 \times 10^{-5} \text{ M}$  (22.1  $\mu\text{g/mL}$ ). The maximum COX-2 inhibition induced by KPFV was 43.5% (50  $\mu\text{g/mL}$ ); therefore the  $\text{IC}_{50}$  for COX-2 inhibition was  $>8.4 \times 10^{-5} \text{ M}$ . The selectivity index (SI;  $\text{COX-1}_{\text{IC}_{50}}/\text{COX-2}_{\text{IC}_{50}}$ ) was  $<0.44$ . The positive control indomethacin also inhibited both COX-1 and COX-2 activities ( $\text{IC}_{50}$  for COX-1 and COX-2 was 5.9 and 31.2  $\mu\text{g/mL}$ , resp., and SI was 0.19).

#### 4. Discussion

The anti-inflammatory potential of *K. pinnata* leaves was evaluated previously in different models [7–9]. Hema et al. [7] attributed the anti-inflammatory activity to the presence of

TABLE 1: Effect of flavonoid KPFV on COX-1 and COX-2 activities.

KPFV concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inhibition (%)	
	COX-1	COX-2
3.125	44.2	18.5
6.25	46.1	20.4
12.5	49.0	26.9
25.0	50.0	38.9
50.0	ND	43.5

sitosterol and aliphatic alcohols without testing any isolated compound. In the same way, there are also some reports that attribute this action to flavonoids [8, 9].

Our research group has been studying, via an interdisciplinary approach, the chemical composition of KP leaves taking into consideration their traditional use for healing wounds and other inflammatory processes. Our findings have demonstrated that KP flavonoids, isolated from the KP leaves extract, possess significant activity in leishmaniasis, asthma, and antiallergenic models, through immunomodulating mechanisms [3, 6].

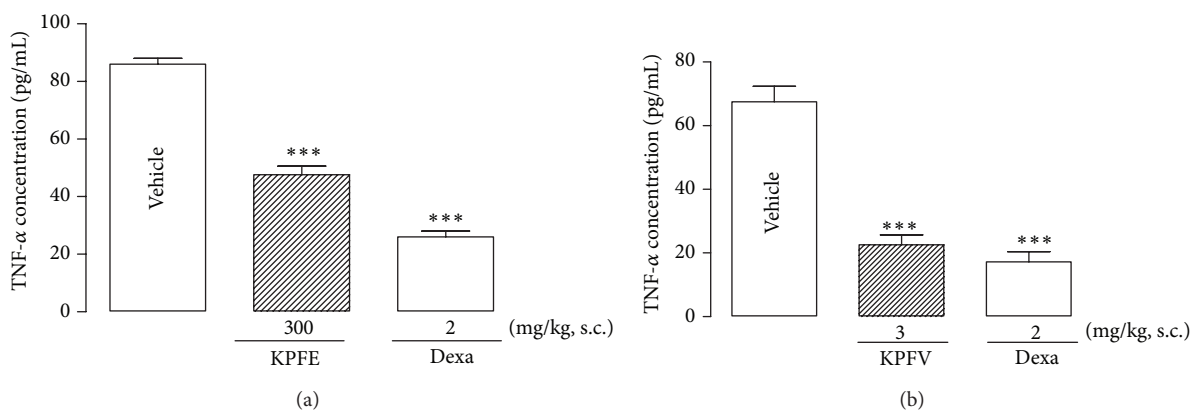


FIGURE 4: Effect of KPFE (a) and KPFEV (b) on TNF- $\alpha$  concentration in the pleural exudates. KPFE, KPFEV, or dexamethasone (Dexa) was subcutaneously administered 30 min before carrageenan injection (1%, 0.1 mL/10 g). The pleural exudates were collected 4 h after the carrageenan injection. TNF- $\alpha$  concentration was determined by ELISA. \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from the vehicle-treated group. Values represent means  $\pm$  SEM of the TNF- $\alpha$  concentration in the pleural exudates (pg/mL) of 8 mice per group.

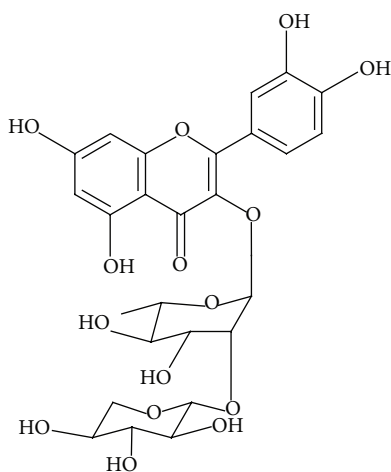


FIGURE 5: Structure of the main flavonoid from KP flowers: quercetin 3- $O$ - $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (KPFV).

Although the flowers present a higher content and variety of flavonoids, there are few studies of the isolation and characterization of bioactive molecules from the KP flowers or their pharmacological potential. Our previous study on the chemical composition of KP flowers led to the isolation of four flavonol glycosides, as well as a flavonol aglycone. Quercetin 3- $O$ - $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (KPFV) (Figure 5) proved to be the most abundant flavonoid in KP flowers (1.87% wt/wt) [10] and therefore is the aim of the present study. The other flavonoids isolated by our group were quercetin 3- $O$ - $\beta$ -glucuronopyranoside (miquelianin, 0.79% wt/wt), quercetin 3- $O$ - $\beta$ -glucopyranoside (isoquercitrin, 0.21% wt/wt), quercetin 3- $O$ - $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (quercitrin, 0.25% wt/wt), and quercetin (0.12% wt/wt). These flavonoids were considered to be the minority compounds [10].

The aglycone quercetin present in the chemical structure of KPFV proved to be an anti-inflammatory and immunosuppression agent [20, 21]. This flavonol has a well-known immunomodulatory effect through the regulation of inflammatory mediators, such as inhibiting cytokine and inducible nitric oxide synthase expression via inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway [15, 22]. Moreover, quercetin has been reported as having anti-inflammatory properties in experimental murine allergic asthma [23]. A study using human peripheral blood mononuclear cells showed the quercetin role in modulating the TNF- $\alpha$  production and gene expression, and this effect is linked to the modulation of the NF- $\kappa$ B1 and I $\kappa$ B pathways [24]. This flavonoid also inhibits PGE<sub>2</sub> and nitric oxide production in IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells [25].

The content of the diglycosyl flavonoid KPFV in KP flowers is more than 2 times greater than the content of miquelianin. When comparing with isoquercitrin and quercitrin, the content of KPFV is 9 and 7 times higher, respectively. Recently we have shown that KPFV impairs T-cell proliferation (IC<sub>50</sub> 38.8  $\mu$ g/mL) and it was able to inhibit the production of IL-2 and IL-4 cytokines [10]. The use of this flavonoid for antiallergenic purpose was the basis of a Japanese patent [26].

In present study the aqueous extract from *K. pinnata* flowers (KPFE) produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced writhing indicating the antinociceptive activity. The main flavonoid (KPFV) also produced antinociceptive activity in the acetic acid-induced writhing model using doses up to 30 times lower than KPFE, suggesting the involvement of flavonoids, especially KPFV, in the antinociceptive effect of the flower extracts. The nociception induced by this assay is mediated by cyclooxygenase, such as PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , and PGI<sub>2</sub>, and lipoxygenase products, such as LTB<sub>4</sub> [27, 28], which can explain its sensitivity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as indomethacin [29].

Later, the anti-inflammatory effect of KPFE and the enriched-flavonoid fractions (EtOAcF and BuOHF) was evidenced by the reduction in the total leukocyte migration

to the pleural cavity induced by carrageenan. This result could be explained, at least partially, by the high content of KPFV flavonoid in the EtOAcF (22.9%) and BuOHF (39.5%) fractions. Moreover, KPFV exhibited the same effect at doses up to 100 times lower than KPFE, demonstrating that KPFV is also involved in the anti-inflammatory effect of the flower extracts. Furthermore, carrageenan-induced leukocyte migration is dependent on the synthesis/release of the chemoattractants mediators leukotrienes such as LTB<sub>4</sub> [30], cytokines IL-1 and TNF- $\alpha$  [31], and chemokines [32]. Pretreatment with KPFE or its main flavonoid KPFV reduced the TNF- $\alpha$  concentration in pleural exudates, suggesting that they produce an anti-inflammatory effect, at least in part, by TNF- $\alpha$  inhibition.

The anti-inflammatory activities of KPFE and its main flavonoid were also evidenced by the croton oil-induced ear edema test. Topical application of croton oil induces an acute inflammatory response mainly characterized by fluid accumulation and edema formation. The edema formation is initially mediated by histamine and serotonin and later by the release of prostaglandins [28]. 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetate, a phorbol ester present in croton oil, has been reported to stimulate phospholipid-dependent protein kinase C and the overexpression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 [33]. In this inflammatory model the dose-related inhibition of KPFE was detected at doses up to 100 times smaller (3 to 30 mg/kg) than used in leukocyte migration. Similarly, KPFV produced a reduction of edema formation and its effectiveness was obtained using lower doses when compared to KPFE and was active from 0.3 mg/kg. These findings are very promising considering that, recently, the anti-inflammatory activity of the leaf extract from KP was attributed to a novel steroid derivative, when Afzal et al. [34], using the model of carrageenan-induced rat paw edema and oral administration, showed that the extract (400 mg/kg) and the steroid (300 mg/kg) reduced the inflammation by 87% and 84%, respectively. These authors [34] needed to administer a high dose of the steroid compound from the leaf extract to obtain approximately the same effect as our results using the KPFV flavonoid. Furthermore, KPFE and KPFV produce antiedematogenic effect at lower doses than those required to produce antinociceptive effects, suggesting that they are more effective to produce the antiedematogenic and anti-inflammatory effects than the antinociceptive effect, as observed to other extracts or isolated compounds [35–37].

Prostaglandins play an important role in the setting of the cardinal signs of inflammation, pain, heat, redness, edema, and loss of function. The biosynthesis of PGE<sub>2</sub>, the main inflammatory prostaglandin, involves three key enzymes, phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), cyclooxygenase (COX), and PGE synthase (PGES) [38]. Some flavonoids may reduce PGE<sub>2</sub> synthesis by inhibiting the activity of these enzymes or by inhibiting the expression of the inflammatory-induced enzymes, COX-2, or microsomal PGES-1 [13, 39, 40]. Our results demonstrated that KPFV, as well as the positive control indomethacin, inhibited the activity of both COX-1 and COX-2. Its selectivity index (SI; COX-1<sub>IC<sub>50</sub></sub>/COX-2<sub>IC<sub>50</sub></sub>) was <0.44, indicating that KPFV has a slightly preferential

inhibition to COX-1. These results indicate that KPFE and its main flavonoid also produce an anti-inflammatory effect by prostaglandins synthesis inhibition through COX inhibition. However, the involvement of other mechanisms of prostaglandins synthesis inhibition remains to be evaluated.

It is worth mentioning that quercetin 3-*O*- $\alpha$ -L-arabino-pyranosyl (1  $\rightarrow$  2)  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (KPFV) is the most abundant flavonoid in both flowers (1.87% w/w) and leaves (2.26% w/w), as reported before [10]. Although this study has focused on the flowers of KP, it seems plausible that these results obtained with KPFV can be extended to the leaves. Thus, the presence of this flavonoid in the leaves must explain at least partially the popular use of the plant in inflammatory disorders.

## 5. Conclusions

For the first time the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory effects of *K. pinnata* flowers and its main flavonoid were described. These effects involve COX-1/COX-2 and TNF- $\alpha$  synthesis/release inhibition. The demonstration of the antinociceptive, antiedematogenic, and anti-inflammatory activities of the main flavonoid present in flowers and leaves [3, 10] of this species represents a major breakthrough in the pharmacological knowledge of a medicinal plant widely used in inflammatory processes.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Authors' Contribution

Raquel Teixeira Ferreira and Marcela Araújo Soares Coutinho contributed equally to this study.

## Acknowledgments

The authors are grateful to CAPES (Brazil) for fellowships to Marcela Araújo Soares Coutinho and Raquel Teixeira Ferreira, Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Brazil (FAPERJ), and Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia for financial support.

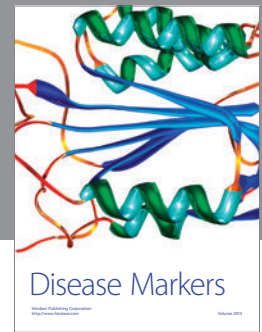
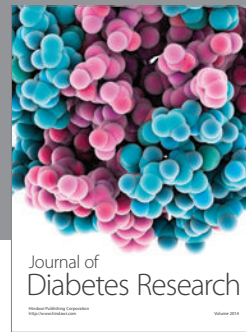
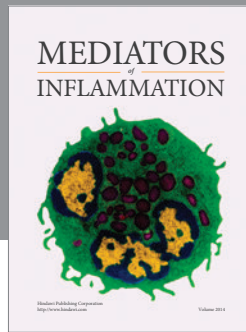
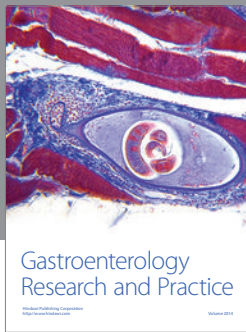
## References

- [1] O. S. M. Bopda, F. Longo, T. N. Bella et al., "Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 153, no. 2, pp. 400–407, 2014.
- [2] E. F. Aransiola, M. O. Daramola, E. O. Iwalewa, A. M. Seluwa, and O. O. Olufowobi, "Anti-diabetic effect of *Bryophyllum pinnatum* leaves," *International Journal of Biological, Life Science and Engineering*, vol. 8, no. 1, pp. 51–55, 2014.

- [3] S. S. Costa, M. F. Muzitano, L. M. M. Camargo, and M. A. S. Coutinho, "Therapeutic potential of *Kalanchoe* species: flavonoids and other secondary metabolites," *Natural Product Communications*, vol. 3, no. 12, pp. 2151–2164, 2008.
- [4] R. Milad, S. El-Ahmady, and A. N. Singab, "Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties," *European Journal of Medicinal Plants*, vol. 4, no. 1, pp. 86–104, 2014.
- [5] C. Aoki, S. Hartati, M. R. Santi et al., "Isolation and identification of substances with anti-hepatitis c virus activities from *Kalanchoe pinnata*," *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 6, no. 2, pp. 211–215, 2014.
- [6] E. A. Cruz, S. Reuter, H. Martin et al., "*Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease," *Phytomedicine*, vol. 19, no. 2, pp. 115–121, 2012.
- [7] D. Hema, M. Tidjani, E. Bssene, L. Posset, and H. Giono-Barber, "Plantes médicinales africaines XXIV étude de l'action anti-inflammatoire de *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae)," *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, vol. 20, no. 3, pp. 231–235, 1986.
- [8] J. A. O. Ojewole, "Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 99, no. 1, pp. 13–19, 2005.
- [9] P. J. C. Sousa, J. C. S. Rocha, A. M. Pessoa, L. A. D. Alves, and J. C. T. Carvalho, "Preliminary study of the anti-inflammatory activity of *Bryophyllum calycinum* Salisb," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 15, no. 1, pp. 60–64, 2005.
- [10] M. A. S. Coutinho, M. F. Muzitano, E. A. Cruz et al., "Flowers from *Kalanchoe pinnata* are a rich source of T cell-suppressive flavonoids," *Natural Product Communications*, vol. 7, no. 2, pp. 175–178, 2012.
- [11] E. Middleton Jr., C. Kandaswami, and T. C. Theoharides, "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer," *Pharmacological Reviews*, vol. 52, no. 4, pp. 673–751, 2000.
- [12] A. B. Dongmo, T. Miyamoto, K. Yoshikawa, S. Arihara, and M.-A. Lacaille-Dubois, "Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities," *Planta Medica*, vol. 73, no. 11, pp. 1202–1207, 2007.
- [13] Y. Takano-Ishikawa, M. Goto, and K. Yamaki, "Structure-activity relations of inhibitory effects of various flavonoids on lipopolysaccharide-induced prostaglandin E<sub>2</sub> production in rat peritoneal macrophages: comparison between subclasses of flavonoids," *Phytomedicine*, vol. 13, no. 5, pp. 310–317, 2006.
- [14] C.-C. Chen, M.-P. Chow, W.-C. Huang, Y.-C. Lin, and Y.-J. Chang, "Flavonoids inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells through activator protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B: structure-activity relationships," *Molecular Pharmacology*, vol. 66, no. 3, pp. 683–693, 2004.
- [15] K. Morikawa, M. Nonaka, M. Narahara et al., "Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats," *Life Sciences*, vol. 74, no. 6, pp. 709–721, 2003.
- [16] I. Peluso, A. Raguzzini, and M. Serafini, "Effect of flavonoids on circulating levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in humans: a systematic review and meta-analysis," *Molecular Nutrition & Food Research*, vol. 57, no. 5, pp. 784–801, 2013.
- [17] P. J. Vacher, P. Duchéne-Marullaz, and P. Barbot, "A propos de quelques produits usuels—comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques," *Medicina Experimentalis*, vol. 11, pp. 51–58, 1964.
- [18] D. B. M. Barbosa, M. V. M. Nascimento, R. C. Lino et al., "Mechanism involved in the anti-inflammatory effect of *Spiranthera odoratissima* (Manacá)," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, vol. 22, no. 1, pp. 137–143, 2011.
- [19] G. F. Passos, E. S. Fernandes, F. M. da Cunha et al., "Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 110, no. 2, pp. 323–333, 2007.
- [20] J.-M. Cherg, W. Chiang, and L.-C. Chiang, "Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids," *Food Chemistry*, vol. 106, no. 3, pp. 944–950, 2008.
- [21] K. Morikawa, M. Nonaka, M. Narahara et al., "Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats," *Life Sciences*, vol. 74, no. 6, pp. 709–721, 2003.
- [22] S. C. Bischoff, "Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 11, no. 6, pp. 733–740, 2008.
- [23] A. P. Rogerio, A. Kanashiro, C. Fontanari et al., "Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma," *Inflammation Research*, vol. 56, no. 10, pp. 402–408, 2007.
- [24] M. P. Nair, S. Mahajan, J. L. Reynolds et al., "The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF- $\kappa$ B system," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 13, no. 3, pp. 319–328, 2006.
- [25] J. H. Kwon, J. H. Kim, S. E. Choi, K. H. Park, and M. W. Lee, "Inhibitory effects of phenolic compounds from needles of *Pinus densiflora* on nitric oxide and PGE<sub>2</sub> production," *Archives of Pharmacol Research*, vol. 33, no. 12, pp. 2011–2016, 2010.
- [26] M. Ichikawa, M. Ogura, and T. Iijima, "Antiallergic flavone glycoside from *Kalanchoe pinnatum*," JP Patent 61,118, 396, 1986.
- [27] L. R. Ballou, R. M. Botting, S. Goorha, J. Zhang, and J. R. Vane, "Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 18, pp. 10272–10276, 2000.
- [28] Z. Parveen, Y. Deng, M. K. Saeed, R. Dai, W. Ahamad, and Y. H. Yu, "Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside," *Yakugaku Zasshi*, vol. 127, no. 8, pp. 1275–1279, 2007.
- [29] Z. A. Zakaria, H. K. Gopalan, H. Zainal et al., "Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* chloroform extract in animal models," *Yakugaku Zasshi*, vol. 126, no. 11, pp. 1171–1178, 2006.
- [30] P. V. Afonso, M. Janka-Junttila, Y. J. Lee et al., "LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis," *Developmental Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 1079–1091, 2012.
- [31] T. S. Fröde, G. E. P. Souza, and J. B. Calixto, "The modulatory role played by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy," *Cytokine*, vol. 13, no. 3, pp. 162–168, 2001.
- [32] M.-J. Sanz and P. Kubes, "Neutrophil-active chemokines in vivo imaging of neutrophil trafficking," *European Journal of Immunology*, vol. 42, no. 2, pp. 278–283, 2012.
- [33] H. N. Lee, H. J. Cho, D. Y. Lim, Y.-H. Kang, K. W. Lee, and J. H. Y. Park, "Mechanisms by which licochalcone e exhibits potent anti-inflammatory properties: studies with phorbol ester-treated mouse skin and lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 6, pp. 10926–10943, 2013.

- [34] M. Afzal, G. Gupta, I. Kazmi et al., "Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 5, pp. 853–858, 2012.
- [35] C. M. Lima, A. K. Lima, M. G. D. Melo et al., "Bioassay-guided evaluation of *Dioscorea villosa*—an acute and subchronic toxicity, antinociceptive and anti-inflammatory approach," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 13, article 195, 2013.
- [36] Q.-S. Wang, L. Yang, W.-Y. Cui, L. Chen, and Y.-H. Jiang, "Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of methanol extract from aerial part of *Phlomis younghusbandii* Mukerjee," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 3, Article ID e89149, 2014.
- [37] N. Darshika Kodithuwakku, M. Pan, Y.-L. Zhu et al., "Anti-inflammatory and antinociceptive effects of Chinese medicine SQ gout capsules and its modulation of pro-inflammatory cytokines focusing on gout arthritis," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 150, no. 3, pp. 1071–1079, 2013.
- [38] A. D. Mancini and J. A. Di Battista, "The cardinal role of the phospholipase A2/cyclooxygenase-2/ prostaglandin synthase/ prostaglandin E2 (PCPP) axis in inflammotaxis," *Inflammation Research*, vol. 60, no. 12, pp. 1083–1092, 2011.
- [39] M. Hämäläinen, R. Nieminen, M. Z. Asmawi, P. Vuorela, H. Vapaatalo, and E. Moilanen, "Effects of flavonoids on prostaglandin E<sub>2</sub> production and on COX-2 and mPGES-1 expressions in activated macrophages," *Planta Medica*, vol. 77, no. 13, pp. 1504–1511, 2011.
- [40] A. Koeberle, J. Bauer, M. Verhoff, M. Hoffmann, H. Northoff, and O. Werz, "Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits microsomal prostaglandin E<sub>2</sub> synthase-1," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 388, no. 2, pp. 350–354, 2009.





# Hindawi

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>

