

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**MICHEL DAVID DOS SANTOS**

***Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e  
considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias  
bioativas.**

RIBEIRÃO PRETO

2006

MICHEL DAVID DOS SANTOS

***Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e  
considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias  
bioativas.**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Doutor em  
Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos  
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto  
2006

## FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Michel David dos

*Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas.

Ribeirão Preto, 2006.

152 p., 41 il.; 30 cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área: Ciências Farmacêuticas (Produtos Naturais e Sintéticos).

Orientador: Norberto Peporine Lopes

1. *Lychnophora ericoides*. 2. Antiinflamatório. 3. Analgésico. 4. Ácidos cafeoilquínicos. 5. Vicenina-2. 6. PGE2. 7. MCP-3. 8. Metaloporfirina. 9. Oxidação.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Michel David dos Santos

*Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias ativas.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Agradeço a Deus o privilégio de ter ao meu lado uma pessoa única, que ao mesmo tempo é forte e dócil, independente e carente, sábia e aprendiz, amiga e mulher. O meu amor, a minha admiração e o meu orgulho por você aumentam a cada dia que passamos juntos.*

*Este trabalho é dedicado à minha querida Camila.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, O Criador.

Aos meus pais, Djair e Rosana, por terem me proporcionado nascer, crescer e conviver em um ambiente familiar íntegro e sadio no qual o carinho, o apoio e os ensinamentos de como agir corretamente foram fundamentais para minha formação como homem. Pai e mãe, esta tese também é fruto da dedicação de vocês.

Ao meu irmão, Daniel, uma pessoa cujo coração não cabe dentro do peito.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pela amizade e confiança, pelos ensinamentos e pela orientação na condução deste trabalho.

À Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza, pela amizade e confiança, pelos ensinamentos e pela orientação na condução deste trabalho.

Ao Dr. R. Clark Lantz, por me receber de braços abertos em seu laboratório para a realização do estágio de doutorado no exterior.

À Profa. Dra. Yassuko Iamamoto, pela colaboração no desenvolvimento da tese.

Muitas pessoas contribuíram, em diferentes etapas, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Agradeço de coração aos alunos, funcionários e professores do Laboratório de Química Orgânica e do Laboratório de Farmacologia do Departamento de

Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, do Laboratório de Bioinorgânica do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP e do Laboratório de Toxicologia Pulmonar do Departamento de Biologia Celular e Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade do Arizona.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida no início do desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente através da concessão da bolsa de doutorado no exterior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro para condução deste projeto.

## RESUMO

SANTOS, M. D. *Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. 2006. 152 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

O estudo de determinada espécie vegetal com fins medicinais é uma tarefa multidisciplinar que envolve a realização de pesquisas físicas, químicas e biológicas. Neste contexto, estudos farmacológicos e toxicológicos possuem papel de destaque pois permitem avaliar parâmetros como segurança e eficácia do medicamento, essenciais para o paciente e necessários para o registro aos órgãos reguladores. *Lychnophora ericoides* (arnica da serra), uma espécie endêmica no Brasil, é amplamente utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de dor e inflamação. Por outro lado, a espécie carece de estudos para comprovar sua segurança e propriedades terapêuticas. Assim, os objetivos deste trabalho são: realizar ensaios farmacológicos *in vivo* para avaliar as propriedades analgésica (modelo da contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos e teste da formalina em ratos), antiinflamatória (edema de pata induzido por carragenina em ratos) e antipirética (febre induzida por LPS em ratos) de frações polares de *L. ericoides* e do ácido clorogênico (CGA, ácido 5-cafeoilquínico); avaliar o efeito de metabólitos secundários de *L. ericoides* sobre a síntese de mediadores inflamatórios produzidos por células U-937 cultivadas *in vitro*; e estudar o metabolismo oxidativo destes metabólitos em reações catalisadas por metaloporfirinas sintéticas (sistema biomimético do citocromo P450) e por mitocôndrias isoladas de fígado de ratos. Os resultados obtidos nos ensaios farmacológicos mostram que as propriedades farmacológicas do vegetal estão distribuídas em partes distintas da planta. Enquanto as raízes são predominantemente analgésicas, as folhas são tanto analgésicas como antiinflamatórias. Ainda, o ACG possui propriedades tanto analgésica como antiinflamatória, mas não antipirética. Quanto ao efeito dos metabólitos secundários sobre a produção de mediadores inflamatórios, observa-se que a vicenina-2 (VIC-2) é capaz de reduzir significativamente o mediador prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Este efeito da VIC-2 sobre a PGE<sub>2</sub> não decorre da inibição da transcrição/tradução da enzima ciclooxigenase-2 e também não decorre da inibição direta da atividade catalítica da enzima. Baixas concentrações do ácido 3,5-dicafeoilquínico e do ácido 4,5-dicafeoilquínico possuem efeito moderado sobre a produção de PGE<sub>2</sub>, enquanto altas doses levam a um aumento da produção do mediador. Além disso, os ácidos dicafeoilquínicos mencionados e o ácido 3,4,5-tricafeoilquínico são capazes de inibir significativamente a produção da proteína quimioatraente de monócitos-3 (MCP-3), envolvida na migração de células imunes para o foco inflamatório. O ACG é capaz de inibir algumas citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-6 e MCP-3. Por outro lado, seu metabólito oxidado majoritário OX-ACG, obtido nas reações biomiméticas com metaloporfirina, é inativo ou fracamente ativo sobre estes mediadores. Os resultados do metabolismo oxidativo do ACG por metaloporfirinas sintéticas mostram a formação de 3 metabólitos: hidroxilado, dicarbonilado e carbonilado (OX-ACG), sendo o último produzido majoritariamente neste sistema biomimético. O mesmo padrão de oxidação foi verificado nas reações de metabolismo oxidativo dos ácidos dicafeoilquínicos. Por fim, o único metabólito oxidado do ACG produzido por mitocôndrias de fígado de ratos corresponde ao metabólito carbonilado majoritário OX-ACG obtido das reações com metaloporfirina.

Palavras-chave: *Lychnophora ericoides*. Antiinflamatório. Analgésico. Ácidos cafeoilquínicos. Vicenina-2. PGE<sub>2</sub>. MCP-3. Metaloporfirina. Oxidação.



## SUMMARY

SANTOS, M. D. *Lychnophora ericoides* Mart: pharmacological evaluation and considerations on the oxidative metabolism from its bioactive compounds. 2006. 152 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

The scientific study of medicinal plants is a multidisciplinary task and involves many fields of knowledge such as physics, chemistry and biology. In this context, pharmacological and toxicological studies play an important role since they allow evaluating parameters such as safety and efficacy. These parameters have to be well established, being essential for the patient's safety and mandatory for the regulatory agencies. *Lychnophora ericoides* (arnica da serra), an endemic plant from Brazil, is widely used in traditional medicine to treat pain and inflammation. On the other hand, the species still lacks solid information on its safety and therapeutic properties. Therefore, the goals of this study are: to perform *in vivo* pharmacological assays (acetic acid-induced writhing test in mice, formalin pain in rats, carrageenan-induced rat paw edema, LPS-induced fever in rats) with polar fractions from *L. ericoides* and also chlorogenic acid (CGA, 5-caffeoylquinic acid); to evaluate the effect of secondary metabolites from *L. ericoides* on the synthesis of inflammatory mediators produced by *in vitro* cultured U-937 cells; to study the oxidative metabolism of the metabolites aforementioned catalyzed by synthetic metalloporphyrin (cytochrome P450 biomimetic system) and also by rat liver mitochondria. The results obtained in the pharmacological assays show that the analgesic and anti-inflammatory activities are distributed in distinct parts of the plant. Whereas the roots are predominantly analgesic, the leaves are both analgesic and anti-inflammatory. Also, CGA present both analgesic and anti-inflammatory activities but no antipyretic activity. When it comes to the effect of the secondary metabolites on the production of inflammatory mediators, vicenin-2 (VIC-2) is able to significantly inhibit PGE<sub>2</sub> in a dose-dependent fashion. The effect exerted by VIC-2 on PGE<sub>2</sub> is due neither to its inhibition on the synthesis of cyclooxygenase-2 nor on the direct inhibition of the catalytic activity of the enzyme. Lower concentrations of 3,5-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids present a slight inhibitory effect on PGE<sub>2</sub> synthesis; however, increasing doses stimulate the production of the mediator. In addition, the dicaffeoylquinic acids and the 3,4,5-tricaffeoylquinic acid are able to significantly inhibit the production of the chemokine monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3), involved in the migration of immune cells to the inflammatory site. CGA is able to inhibit some of the evaluated cytokines, such as tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and MCP-3. On the other hand, the major oxidized metabolite from CGA (OX-CGA) obtained from the metalloporphyrin biomimetic reactions is inactive or weakly active on the production of such cytokines. The results obtained in the metalloporphyrin-catalyzed oxidation reactions of CGA show the formation of 3 metabolites: hydroxylated, dicarbonylated and carbonylated (OX-CGA), the last being the major compound obtained in this biomimetic system. The same oxidation pattern is observed in the biomimetic oxidation of the dicaffeoylquinic acids. Finally, the single CGA oxidized metabolite produced by rat liver mitochondria corresponds to the carbonylated metabolite OX-CGA obtained in the metalloporphyrin reactions.

**Keywords:** *Lychnophora ericoides*. Anti-inflammatory. Analgesic. Caffeoylquinic acids. Vicenin-2. PGE<sub>2</sub>. MCP-3. Metalloporphyrin. Oxidation.

## ÍNDICE

<b>Lista de figuras .....</b>	<b>i</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>001</b>
1.1 Plantas medicinais, descoberta e desenvolvimento de fármacos – passado, presente e futuro.....	001
1.2 A espécie <i>Lychnophora ericoides</i> , uma planta medicinal endêmica no Brasil .....	007
1.3 Uma visão geral sobre o processo inflamatório .....	014
1.4 Ensaios <i>in vitro</i> para a avaliação do efeito de fármacos e a linhagem celular U-937 .	017
1.5 A importância dos estudos de metabolismo no processo de desenvolvimento de medicamentos .....	020
1.6 Metaloporfirinas sintéticas como modelo para o estudo de metabolismo de fármacos.....	024
1.7 O emprego de técnicas hifenadas em estudos de metabolismo de fármacos.....	027
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>029</b>
2.1 Objetivos gerais .....	029
2.2. Objetivos específicos.....	029
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>031</b>
3.1 Preparação, processamento, reisolamento e identificação dos ácidos cafeoilquínicos do extrato das raízes de <i>Lychnophora ericoides</i> .....	031
3.1.1 Substâncias, solventes e reveladores .....	031
3.1.2 Cromatografia em coluna (CC) .....	031
3.1.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	032
3.1.4 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	032
3.1.5 Isolamento e identificação (procedimento) .....	032
3.2 Ensaios farmacológicos .....	040
3.2.1 Animais.....	040
3.2.2 Tratamentos .....	040
3.2.3 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos .....	041
3.2.4 Ensaio de edema de pata em ratos induzido por carragenina.....	041

3.2.5	Teste da formalina em ratos .....	041
3.2.6	Ensaio de febre induzida por LPS em ratos.....	042
3.2.7	Análise estatística .....	043
3.3	Avaliação da produção de mediadores inflamatórios produzidos por células cultivadas <i>in vitro</i> .....	043
3.3.1	Reagentes e meio de cultura .....	043
3.3.2	Cultura e diferenciação celular.....	044
3.3.3	Ensaio de viabilidade celular .....	045
3.3.4	Tratamentos .....	046
3.3.5	Imunoensaios para quantificação de prostaglandina E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).....	046
3.3.6	Imunoensaios para quantificação de fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	047
3.3.7	Imunoensaios de detecção múltipla e simultânea de citocinas inflamatórias.....	048
3.3.8	Imunoensaios para quantificação de interleucina-6 (IL-6).....	049
3.3.9	Imunoensaios para quantificação de proteína quimiotática para monócitos-3 (MCP-3).....	049
3.3.10	Isolamento de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) .....	050
3.3.11	Reação de transcrição reversa para geração de ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA) .....	051
3.3.12	Ensaio de quantificação da expressão gênica através da reação em cadeia da polimerase em tempo real ( <i>real time-polymerase chain reaction</i> , RT-PCR).....	051
3.3.13	Análise da expressão de proteínas ( <i>Western Blot</i> ) .....	052
3.3.14	Ensaio de inibição direta da enzima cicloxigenase (COX) .....	055
3.3.15	Análise estatística .....	055
3.4	Reações de metabolismo oxidativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	056
3.4.1	Substâncias e solventes.....	056
3.4.2	Reações de oxidação biomimética catalisada por metaloporfirina sintética .....	056
3.4.3	Análises por HPLC, ESI-MS, ESI-MS-MS e HPLC-ESI-MS-MS .....	057
3.4.4	Reação de metabolismo <i>in vitro</i> por mitocôndrias isoladas de fígado de ratos..	058
3.4.5	Cálculos semi-empíricos .....	060
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>061</b>
4.1	Avaliação das atividades farmacológicas das frações polares de <i>Lychnophora ericoides</i> e do ACG (ácido clorogênico) em animais experimentais .....	061
4.1.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória da LERA, LERB e ACG no ensaio de edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	062

4.1.2 Avaliação da atividade analgésica da LEFA e LEFB no ensaio de contorções abdominais induzidas por HAc em camundongos .....	063
4.1.3 Avaliação da atividade analgésica da LERB e do ACG no modelo da dor induzida pela formalina em ratos .....	064
4.1.4 Avaliação da atividade antipirética do ACG no modelo da febre induzida por LPS em ratos.....	065
4.2 Avaliação dos efeitos dos ácidos caféico, quínico, clorogênico, dicafeoilquínicos, do flavonóide vicenina-2, e do ácido clorogênico oxidado sobre a produção de mediadores inflamatórios por células U-937 cultivadas <i>in vitro</i> .....	073
4.2.1 Ensaios de viabilidade celular .....	073
4.2.2 Ensaios de quantificação de PGE <sub>2</sub> .....	078
4.2.3 Ensaios de quantificação de TNF- $\alpha$ .....	083
4.2.4 Ensaios de detecção múltipla e simultânea de citocinas inflamatórias .....	089
4.2.5 Ensaios de quantificação de IL-6 .....	092
4.2.6 Ensaios de quantificação de MCP-3.....	093
4.2.7 Ensaio de quantificação da expressão gênica ( <i>Real-Time PCR</i> ).....	096
4.2.8 Análise da expressão de proteínas ( <i>Western Blot</i> ) .....	097
4.2.9 Ensaio de inibição direta da enzima cicloxigenase (COX) .....	099
4.3 Reações de metabolismo oxidativo empregando metaloporfirinas sintéticas e mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.....	101
4.3.1 Análises por ESI-MS e ESI-MS-MS dos compostos AC, AQ, ACG, 3,5-DCQ e 4,5-DCQ .....	101
<i>ESI-MS e ESI-MS-MS do ácido caféico (AC)</i> .....	102
<i>ESI-MS e ESI-MS-MS do ácido quínico (AQ)</i> .....	106
<i>ESI-MS e ESI-MS-MS do ácido clorogênico (ACG) e ácidos dicafeoilquínicos (3,5-DCQ e 4,5-DCQ)</i> .....	108
4.3.2 Reações de oxidação biomimética do ACG catalisadas por metaloporfirina sintética e metabolismo oxidativo por mitocôndrias isoladas de fígado de ratos .....	111
4.3.3 Reações de oxidação biomimética do 3,5-DCQ e 4,5-DCQ catalisadas por metaloporfirina sintética.....	119
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>122</b>
5.1 Ensaios farmacológicos <i>in vivo</i> .....	122
5.2 Ensaios farmacológicos <i>in vitro</i> .....	122

5.3 Oxidação dos ácidos cafeoilquínicos catalisadas por metaloporfirina sintética e mitocôndrias de fígado de ratos.....	124
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>125</b>
<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>141</b>
<b>Anexo 1.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de LERB12 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz), identificado como ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico.....	141
<b>Anexo 2.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de LERB13 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz), identificado como ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico.....	142
<b>Anexo 3.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de LERB16 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz), identificado como ácido 3,4,5-tri- <i>O-E</i> -cafeoilquínico .....	143
<b>Anexo 4.</b> Artigo publicado no <i>European Journal of Pharmaceutical Sciences</i> .....	144

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fontes de agentes terapêuticos envolvidos no desenvolvimento de novos fármacos.....	006
<b>Figura 2.</b> Estruturas químicas dos polifenóis isolados de frações polares de <i>Lychnophora</i> (excetuando-se o ácido quínico) avaliados neste estudo.....	011
<b>Figura 3.</b> <i>Lychnophora ericoides</i> Mart (Asteraceae).....	012
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática dos possíveis intermediários do ciclo catalítico do citocromo P450.....	023
<b>Figura 5.</b> Prováveis mecanismos de reação de hidroxilação catalisados por enzimas do citocromo P450: mecanismo concertado e mecanismo de recombinação de oxigênio ( <i>oxygen rebound</i> ).....	023
<b>Figura 6.</b> Processamento do extrato bruto hidrometanólico e da fração <i>n</i> -butanólica (LERB) das raízes de <i>Lychnophora ericoides</i> .....	034
<b>Figura 7.</b> Efeito da fração aquosa (LERA, painel A) e fração <i>n</i> -butanólica (LERB, painel B) do extrato polar das raízes de <i>L. ericoides</i> no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos. ....	062
<b>Figura 8.</b> Efeito do ácido clorogênico (ACG) no teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	063
<b>Figura 9.</b> Efeito da fração aquosa (LEFA) e fração <i>n</i> -butanólica do extrato polar das folhas de <i>L. ericoides</i> no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	064
<b>Figura 10.</b> Efeito da fração <i>n</i> -butanólica do extrato polar das raízes de <i>L. ericoides</i> (LERB, painel A) ou do ácido clorogênico (ACG, painel B) no teste de dor induzida por formalina em ratos. ....	065
<b>Figura 11.</b> Efeito do ácido clorogênico (ACG) no teste da febre induzida pelo LPS em ratos. ....	066
<b>Figura 12.</b> Efeito do ácido caféico (AC), ácido quínico (AQ), ácido clorogênico (ACG) e ácido clorogênico oxidado (OX-ACG) sobre a viabilidade de células U-937. ....	074
<b>Figura 13.</b> Efeito do ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ), ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQ) e da vicenina-2 (VIC-2) sobre a viabilidade de células U-937. ....	075
<b>Figura 14.</b> Efeito do ácido quínico (AQ), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACG) e ácido clorogênico oxidado (OX-ACG) sobre produção de PGE <sub>2</sub> por células U-937.....	078

<b>Figura 15.</b> Efeito do ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ), ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQ) e da vicenina-2 (VIC-2) sobre produção de PGE <sub>2</sub> por células U-937.....	081
<b>Figura 16.</b> Efeito do ácido quínico (AQ), ácido caféico (AC), ácido clorogênico (ACG) e ácido clorogênico oxidado (OX-ACG) sobre produção de TNF- $\alpha$ por células U-937. ....	084
<b>Figura 17.</b> Efeito do ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ), ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQ) e da vicenina-2 (VIC-2) sobre produção de TNF- $\alpha$ por células U-937. ....	086
<b>Figura 18.</b> Radiografias de membranas impregnadas com anticorpos anti-citocinas após incubação com sobrenadantes de células tratadas com LPS (A) ou LPS + ACG 200 $\mu$ g/ml (B), e os respectivos mapas das citocinas avaliadas (C e D) evidenciando-se a inibição (azul).....	090
<b>Figura 19.</b> Radiografias de membranas impregnadas com anticorpos anti-citocinas após incubação com sobrenadantes de células tratadas com LPS (A) ou LPS + Vicenina-2 300 $\mu$ g/ml (B), LPS + 4,5-DCQ 100 $\mu$ g/ml (C) e LPS + 3,4,5-TCQ 50 $\mu$ g/ml (D), e os respectivos mapas das citocinas avaliadas (E, F, G e H) evidenciando-se a inibição (azul) ou estímulo (vermelho). ....	091
<b>Figura 20.</b> Efeito do ácido clorogênico (ACG) e do ácido clorogênico oxidado sobre produção de IL-6 por células U-937.....	092
<b>Figura 21.</b> Efeito do ácido clorogênico (ACG), ácido clorogênico oxidado (OX-ACG), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ) e ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (3,4,5-TCQ) sobre produção de MCP-3 por células U-937. ....	094
<b>Figura 22.</b> Radiografias de membranas de <i>western blot</i> evidenciando as proteínas COX-2 (painel superior) e $\beta$ -actina (painel inferior). ....	098
<b>Figura 23.</b> Efeito da VIC-2 sobre a atividade enzimática da COX-1 e COX-2. ....	099
<b>Figura 24.</b> Espectros de ESI-MS do ACG nos modos ESI+ ( $m/z$ 355, esquerda) e ESI- ( $m/z$ 353, direita).....	102
<b>Figura 25.</b> Espectros de ESI-MS do AC (ESI+).....	103
<b>Figura 26.</b> Espectro de ESI-MS-MS do AC (ESI+), observando-se os fragmentos do íon protonado $m/z$ 181 (20 eV). ....	104
<b>Figura 27.</b> Proposta de fragmentação para o íon $m/z$ 181 ([AC + H] <sup>+</sup> ).....	105
<b>Figura 28.</b> Espectros de ESI-MS (painel A) e ESI-MS-MS (painel B) do AQ (ESI+), resultante da fragmentação do íon protonado $m/z$ 193 (15 kV; 10 eV).....	107
<b>Figura 29.</b> Proposta de fragmentação para o íon $m/z$ 193 ([AQ + H] <sup>+</sup> ).....	107
<b>Figura 30.</b> Espectro de ESI-MS do íon protonado do ACG (ESI+).....	108

<b>Figura 31.</b> Espectros de ESI-MS-MS do ACG nos modos ESI+ (painel A) e ESI- (painel B) e os fragmentos propostos para cada espectro.....	109
<b>Figura 32.</b> Espectros de ESI-MS (painel A) e ESI-MS-MS (painel B) do 3,5-DCQ (ESI+), resultante da fragmentação do íon protonado $m/z$ 517 (20 kV; 20 eV).....	110
<b>Figura 33.</b> Espectros de ESI-MS (painel A) e ESI-MS-MS (painel B) do 4,5-DCQ (ESI+), resultante da fragmentação do íon protonado $m/z$ 517 (20 kV; 20 eV).....	110
<b>Figura 34.</b> Espectro de ESI-MS no modo ESI+ da reação de oxidação do AQ catalisada por MeP. ....	111
<b>Figura 35.</b> Espectros de ESI-MS-MS do ACG hidroxilado (A, $m/z$ 371), carbonilado (B, $m/z$ 369), dicarbonilado (C, $m/z$ 383) e hidroxilado e carbonilado (D, $m/z$ 383), nos quais observa-se a formação de $m/z$ 163 (porção caféica não oxidada).....	113
<b>Figura 36.</b> Produtos de oxidação prováveis do ACG originados da reação catalisada por MeP.....	113
<b>Figura 37.</b> Cromatograma de HPLC-ESI-MS-MS no modo MRM da reação de oxidação do ACG catalisada pela [Fe(TPP)]Cl (painéis A à D) e do metabolismo oxidativo do ACG por mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (painel E). ....	115
<b>Figura 38.</b> Cálculos semi-empíricos dos comprimentos das ligações de hidrogênio entre a função ácido carboxílico e o oxigênio da posição metilênica das moléculas de ACG oxidadas.....	116
<b>Figura 39.</b> Perfis de formação dos produtos oxidados do ACG oriundos da reação catalisada pela [Fe(TPP)]Cl.....	117
<b>Figura 40.</b> Espectros de ESI-MS-MS da reação de oxidação do 4,5-DCQ catalisada por MeP.....	120
<b>Figura 41.</b> Cromatograma de HPLC-ESI-MS-MS (MRM) da reação de oxidação do ácido 4,5-dicafeoilquínico catalisada pela [Fe(TPP)]Cl.....	121



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados dos espectros de RMN <sup>1</sup> H dos compostos LERB12 (1), ácido 3,5-di- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (2) <sup>a</sup> , LERB13 (3), ácido 4,5-di- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (4) <sup>a</sup> , LERB16 (5), metil éster do ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (6) <sup>b,c</sup> e ácido quínico (7) <sup>a</sup> .....	036
<b>Tabela 2.</b> Constantes de acoplamento spin-spin ( <i>J</i> ) dos compostos LERB12 (1), ácido 3,5-di- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (2) <sup>a</sup> , LERB13 (3), ácido 4,5-di- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (4) <sup>a</sup> , LERB16 (5), metil éster do ácido 3,4,5-tri- <i>O</i> -[ <i>E</i> ]-cafeoilquínico (6) <sup>b</sup> e ácido quínico (7) <sup>a</sup> .....	037
<b>Tabela 3.</b> Perfil químico e origem das frações polares de <i>L. ericoides</i> e dos compostos avaliados nos ensaios biológicos.....	039
<b>Tabela 4.</b> Porcentagens de viabilidade celular no teste de citotoxicidade do XTT dos compostos avaliados na concentração de 500 µg/ml.....	077
<b>Tabela 5.</b> Valores de Ct obtidos para as amostras LPS e LPS + VIC-2.....	097
<b>Tabela 6.</b> Efeito dos compostos avaliados neste estudo frente à produção de mediadores inflamatórios produzidos <i>in vitro</i> por células U-937.....	100
<b>Tabela 7.</b> Canais selecionados no modo MRM relativos às possíveis combinações de moléculas de ACG oxidadas.....	11

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$ .....	deslocamento químico (em ppm)
[Fe(TPP)]Cl .....	5,10,15,20-tetrakis-(pentafluorofenil)porfirina
3,4,5-TCQ .....	ácido 3,4,5-tri- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
3,5-DCQ .....	ácido 3,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
4,5-DCQ .....	ácido 4,5-di- <i>O-E</i> -cafeoilquínico
5-HETE .....	ácido 5-hidroxitetraenóico
8-HETE .....	8-hidroxitetraenóico
AA .....	ácido araquidônico
AAS .....	ácido acetilsalicílico
AC .....	ácido caféico (ácido 3,4-diidroxicinâmico)
ACG .....	ácido clorogênico (ácido 5- <i>O-E</i> -cafeoilquínico)
ACN .....	acetona
AINES .....	fármacos antiinflamatórios não esteroidais
AQ .....	ácido quínico (ácido tetraidróxiciclohexano carboxílico)
ARE/EpRE .....	elemento de resposta antioxidante/eletrófilo
CC .....	cromatografia em coluna
CCDC .....	cromatografia em camada delgada comparativa
CCR1 .....	receptor de quimiocina 1
CD <sub>3</sub> OD .....	metanol deuterado
CDNA .....	ácido desoxirribonucléico complementar
COX-1 .....	ciclooxigenase 1
COX-2 .....	ciclooxigenase 2
DCM .....	diclorometano
E.P.M. ....	erro padrão da média
ESI .....	ionização por <i>electrospray</i>
F.E. ....	fase estacionária
F.M. ....	fase móvel
FCFRP-USP .....	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
FEAC .....	éster fenil etílico do ácido caféico
GC .....	cromatografia gasosa
GST .....	glutathione S-transferase
h .....	horas
HAc .....	ácido acético glacial
Hex .....	hexano
HPLC .....	cromatografia líquida de alta eficiência
HTS .....	<i>high throughput screenings</i> (avaliação preliminar em larga escala)
ICAM-1 .....	moléculas de adesão intercelular
IL-1 $\beta$ .....	interleucina-1 $\beta$
IL-1 .....	interleucina-1
IL-6 .....	interleucina-6
IL-8 .....	interleucina-8
IR .....	infravermelho
<i>J</i> .....	constante de acoplamento (em Herz)
LEFA .....	fração aquosa do extrato polar das folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>

LEFB .....	fração <i>n</i> -butanólica do extrato polar das folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>
LERA.....	fração aquosa do extrato polar das raízes de <i>Lychnophora ericoides</i>
LERB .....	fração <i>n</i> -butanólica do extrato polar das raízes de <i>Lychnophora ericoides</i>
LPS .....	lipopolissacarídeo de paredes celulares de bactérias <i>Gram</i> negativas
LST .....	lactona sesquiterpênica
LSTs .....	lactonas sesquiterpênicas
LTB <sub>4</sub> .....	leucotrieno B <sub>4</sub>
LTs.....	leucotrienos
min .....	minutos
<i>m/z</i> .....	relação massa carga
MALDI.....	ionização por dessorção a laser com auxílio de matriz
MAPK.....	proteína quinase ativada por mitógenos
MCP.....	proteína quimioatraente de monócitos
MCP-3 .....	proteína quimiotática para monócitos-3
MeOH.....	metanol
MeP.....	metaloporfirinas
MRM .....	monitoramento de reação múltipla
MRNA .....	ácido ribonucléico mensageiro
MS .....	espectrometria de massas
MS-MS .....	espectrometria de massas acoplada
NF-κB.....	fator nuclear κB
OX-ACG.....	ácido clorogênico oxidado
P450.....	citocromo P450
P450 <sub>red</sub> .....	citocromo P450 redutase
PBS .....	tampão fosfato salina
PBS-T .....	tampão fosfato salina Tween
PGDF.....	fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE <sub>2</sub> .....	prostaglandina E <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub> .....	prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub> .....	prostaciclina
PGs .....	prostaglandinas
PhIO.....	idosilbenzeno
PLA <sub>2</sub> .....	fosfolipase A <sub>2</sub>
PMA .....	12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol 13-acetato
PMN .....	leucócitos polimorfonucleares
PMS .....	metil sulfato de N-metilfenazônio
ppm.....	partes por milhão
PVDF.....	dicloropolivinilideno
RMN <sup>1</sup> H.....	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
ROS .....	espécies reativas de oxigênio
rpm.....	rotações por minuto
RT-PCR .....	reação em cadeia da polimerase em tempo real
s.....	segundos
TNF.....	fator de necrose tumoral
TNF-α.....	fator de necrose tumoral-α
UV .....	ultravioleta

VIC-2 .....	vicenina-2
XTT .....	2,3-Bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Plantas medicinais, descoberta e desenvolvimento de fármacos – passado, presente e futuro

*“Driven by chemistry but increasingly guided by pharmacology and the clinical sciences, drug research has contributed more to the progress of medicine during the past century than any other scientific factor”.*

Jürgen Drews

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para a terapia, como o conhecemos atualmente, possui pouco mais de 100 anos de existência. Dois fatores foram fundamentais para a consolidação deste processo: o estabelecimento dos princípios e métodos da química, permitindo a resolução de vários problemas práticos (principalmente fora do escopo da própria química) e o estabelecimento da farmacologia como uma disciplina bem estruturada (DREWS, 2000). Dentro da química, a teoria pioneira de August Kekulé (1829 – 1896) sobre a estrutura dos compostos orgânicos aromáticos (“teoria do benzeno” - 1865) deu impulso decisivo para o desenvolvimento de corantes (WAINWRIGHT, 2003). A química dos corantes, por sua vez, teve influência marcante na medicina devido à afinidade seletiva de alguns destes corantes por tecidos biológicos, levando Paul Ehrlich (1854 - 1915) a propor a

existência dos quimiorreceptores. A existência de quimiorreceptores diferentes, os quais possuem afinidade por ligantes diferentes, constitui a base da quimioterapia (RIETHMILLER, 2005; VYAS; KRISHNASWAMY, 2006). No século XIX, precisamente em 1815, o isolamento da morfina (HUXTABLE; SCHWARZ, 2001) por Friedrich Sertürner (1783 – 1841) demonstra a importância da química analítica no processo de separação e identificação estrutural de princípios ativos de plantas medicinais. De fato, o desenvolvimento da química analítica nos últimos dois séculos (particularmente a cromatografia, termo cunhado pelo botânico russo Mikhail Tsvet, 1872 - 1919) chegando às recentes técnicas cromatográficas acopladas a detectores espectrométricos ou espectroscópicos (EXARCHOU et al., 2005; NIESSEN; TINKE, 1995) teve impacto decisivo sobre o processo de descoberta de novos fármacos. As novas técnicas desenvolvidas a partir da metade do século XX, como consequência direta dos avanços científicos obtidos após a II Guerra Mundial, também são fatores decisivos para o desenvolvimento de novos medicamentos nunca antes vislumbrados. A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929 (FLEMING, 1929) é um marco deste período, ilustrado pelo declínio constante dos índices de mortalidade principalmente dos países desenvolvidos. Quanto à farmacologia, os trabalhos posteriores a Ehrlich avançaram no sentido da descoberta das diferentes classes terapêuticas atuando em alvos moleculares distintos, sendo estes alvos constituídos basicamente por receptores acoplados à proteína G ou enzimas (DREWS; RYSER, 1997). Também a partir da década de 1950, os avanços na área da química sintética deram impulso ao surgimento da química combinatória. A química combinatória visa a síntese de um grande número de derivados (algumas vezes a partir de um composto líder biologicamente ativo), buscando-se atividades otimizadas dentro da série de compostos. Mais recentemente, os últimos 35 anos testemunharam o surgimento e o desenvolvimento da biologia molecular, que se apresenta como uma ferramenta poderosa no processo de desenvolvimento de medicamentos. Nesta abordagem manipula-se a informação

genética com o intuito de criar novos compostos capazes de atuar sobre mecanismos de ação bioquímicos conhecidos. Dentre os agentes terapêuticos desenvolvidos pela biologia molecular destacam-se os interferons, citocinas e anticorpos monoclonais (JELKMANN, 2004; KO; KOPROWSKI, 2005; MASIHI, 2001).

O advento das ciências genômicas, do sequenciamento rápido de DNA, da química combinatória, dos ensaios celulares e dos *high throughput screenings* (HTS, termo em inglês que significa “avaliação preliminar em larga escala”) levaram a um “novo” conceito em descoberta de medicamentos. De acordo com Drews (2000), neste “novo” conceito a racionalidade científica de químicos e biólogos e a discussão crítica são muitas vezes substituídos pela mágica de números grandiosos, os quais são muitas vezes manipulados por estratégias de mercado e não correspondem à realidade. Assim, apesar dos notáveis avanços trazidos por estas técnicas que se desenvolvem rapidamente, a velocidade de descoberta de novos fármacos ainda encontra-se muito aquém do esperado, principalmente em relação ao volume de recursos investidos. Para ilustrar este fato compara-se o número de compostos avaliados com o número de *hits* (um *hit* corresponde a uma substância que responde positivamente em um ensaio particular e que pode levar ao surgimento de um composto líder). Estima-se que no início da década de 1990 as companhias farmacêuticas tinham estrutura para executar e processar 200 mil pontos de dados (um ponto de dado equivale à avaliação de um composto, em uma concentração, em um determinado ensaio). Já no início do ano 2000 este número foi estimado em quase 50 milhões. Embora tenha havido um crescimento gigantesco quanto à eficiência dos processos de HTS, isto não refletiu em aumento na produtividade em pesquisa das 50 maiores indústrias farmacêuticas (DREWS, 1998; DREWS, 2000; DREWS, 2003). Vários motivos poderiam explicar esta relativa “falta de sucesso”. Dentre eles, protocolos de química combinatória muitas vezes não levam em conta as características dos descritores biológicos, ou seja, das propriedades estruturais dos alvos terapêuticos. Além

disso, existe a necessidade de uma melhor caracterização estrutural destes alvos, permitindo assim que o desenho racional de fármacos seja realizado com maior eficiência (AGRAFIOTIS, 1997; DIXON; VILLAR, 1998). Por fim, Drews (2000) afirma que, para desenvolver novos medicamentos, é muito importante compreender e conseqüentemente validar o papel de alvos moleculares hipotéticos em relação à determinada doença, fato que muitas vezes é negligenciado.

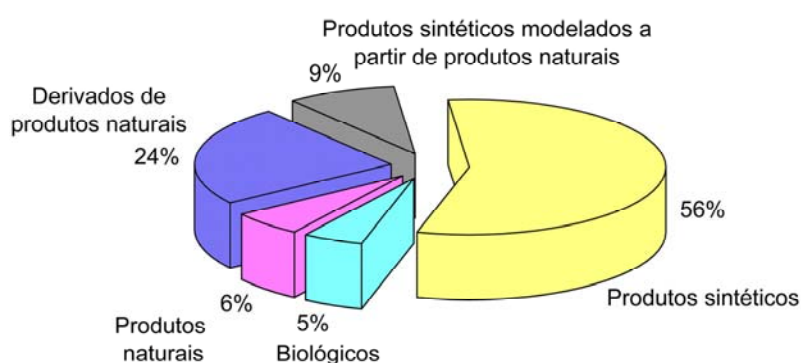
Apesar de todos os avanços da medicina moderna a partir da metade do século passado, as plantas ainda contribuem significativamente para o tratamento e a cura de doenças. Documentos escritos pelas primeiras civilizações comprovam que as plantas medicinais representaram a única fonte de tratamento para as enfermidades, sendo seu uso tão antigo quanto à história do homem (CALIXTO, 2000). Uma análise histórica permite observar que a descoberta e o desenvolvimento de vários medicamentos estão intimamente ligados às plantas. No início, quando os métodos de extração, purificação e identificação ainda não haviam sido desenvolvidos, empregava-se diretamente sucos e extratos do vegetal. Com o desenvolvimento tecnológico, algumas plantas passaram a ser empregadas como fonte para a extração direta dos princípios ativos. Ainda, estes princípios ativos também serviam como material de partida para a síntese de derivados químicos ou mesmo como modelo para a síntese total de fármacos. Talvez o exemplo mais clássico do emprego de plantas medicinais na terapia moderna seja o ácido acetilsalicílico (AAS), um ácido orgânico com propriedades analgésicas e antiinflamatórias reconhecidas (McCURDY; SCULLY, 2005; VANE, 2000). O AAS é um derivado semi-sintético do ácido salicílico, cujos precursores salicina e saligenina são extraídos das cascas de *Salix alba* e *Filipendula ulmaria*. Nesta linha, vários outros exemplos podem ser citados, como o analgésico narcótico morfina (e seus derivados semi-sintéticos codeína e heroína) extraída da *Papaver somniferum* (papoula); as saponinas esteroidais de *Dioscorea* sp. (inhame) e *Agave sisilana* (sisal) que são material de partida para



a síntese de progesterona e cortisona; os relaxantes musculares tubocurarina e C-toxiferina extraídos de *Chondodendron tomentosum* e *Strychnos toxifera*; os glicosídeos cardiotônicos digitoxina e digoxina extraídos de *Digitalis purpurea* e *D. Lanata*; o alcalóide antimalárico quinina extraído da casca de algumas espécies de *Cinchona* spp.; e os alcalóides tropânicos espasmolíticos hiosciamina/atropina e escopolamina de *Atropa beladonna* (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Mais recentemente, entre as décadas de 1980 e 1990, a química de produtos naturais tornou-se a principal linha de pesquisa para a descoberta de novos agentes antitumorais (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Dentre outros exemplos de medicamentos antitumorais destacam-se os alcalóides antileucêmicos vincristina e vimblastina (e o derivado sintético vinorelbina) isolados de *Catharanthus roseus* (CRAGG; NEWMAN, 2005; GREGORY; SMITH, 2000); os diterpenos taxol e docetaxel de *Taxus brevifolia* e os alcalóides camptotecina, topotecan e irinotecan de *Camptotheca acuminata* (HUIZING et al., 1995; OBERLIES; KROLL; 2004).

Além de fornecer princípios ativos para o emprego direto na terapia, as plantas medicinais também podem ser utilizadas como fitoterápicos, os quais são definidos como preparações padronizadas, constituídas de misturas complexas de uma ou mais plantas, usadas para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2000). Neste caso, tanto a atividade farmacológica como os compostos responsáveis por esta atividade devem estar bem definidos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Entretanto, em alguns casos os princípios ativos responsáveis por sua ação farmacológica são desconhecidos e o sinergismo entre as substâncias parece ser o principal responsável pela ação (KINGHORN, 2001). Muito freqüentemente, a atividade dos extratos vegetais não é reproduzida pelas substâncias ativas isoladas. Assim, é possível que a atividade farmacológica seja resultante da ação de mais de um componente, que podem eventualmente atuar sobre os mesmos processos bioquímicos e

podem também contribuir de outras maneiras, modificando a solubilidade, alterando fenômenos de absorção ou influenciando a estabilidade (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2001). Como exemplos de extratos vegetais padronizados que são prescritos atualmente encontra-se o ginko (*Ginkgo biloba*), o qual contém diterpenos (gincolídeos) que melhoram a circulação central e periférica, uma lactona terpênic (bilobalídeo) com propriedades neuroprotetoras e também flavonóides antioxidantes (ZHOU et al., 2004); e a erva de São João (*Hypericum perforatum*) para o tratamento da depressão, cujo modo de ação ainda não está totalmente esclarecido (KASPER, 2001; MENNINI; GOBBI, 2004). De acordo com Mahady (2001), nota-se nos últimos anos um interesse crescente por fármacos e medicamentos de origem vegetal. Para ilustrar tal fato, a Figura 1 mostra que os produtos naturais estavam presentes no desenvolvimento de 44% de todas os novos medicamentos, sendo que muitos destes produtos naturais eram (e ainda são) originários de plantas (CRAGG;



NEWMAN; SNADER, 1997).

**Figura 1.** Fontes de agentes terapêuticos envolvidos no desenvolvimento de novos fármacos. Adaptado de Cragg, Newman e Snader, 1997.

Ao tornar-se um tópico de importância global, o assunto vem gerando repercussões tanto na área da saúde mundial como no mercado internacional. Vários conglomerados farmacêuticos, os quais destinam parcela considerável de seus lucros para o desenvolvimento de novos medicamentos, aumentaram a pesquisa em extratos de plantas para descobrir novas

substâncias ativas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Alguns fatores vêm contribuindo para o crescimento deste interesse como, por exemplo, a preferência dos consumidores por terapias naturais e a crença (muitas vezes infundada) de que remédios vegetais não possuem efeitos colaterais, uma vez que milhões de pessoas empregam as ervas há milhares de anos (KINGHORN, 2001). De acordo com Vuorela et al. (2004), o uso dos produtos naturais na terapia continua vivo e presente devido à dificuldade crescente em se descobrir, e também desenvolver, entidades moleculares novas. Entidades moleculares novas são substâncias biologicamente ativas com esqueletos químicos e diversidade estrutural inéditos. Assim, a descoberta de novas classes terapêuticas constitui um desafio aos cientistas como, por exemplo, para o tratamento de doenças como os males de Alzheimer e Parkinson.

Em suma, as plantas medicinais representam uma reserva praticamente inexplorada de substâncias úteis à humanidade. Aproximadamente 420 mil espécies vegetais são conhecidas (BRAMWELL, 2000), e menos de 5% destas foram avaliadas para uma ou mais atividades biológicas (VERPOORTE; VAN DER HEIJDEN; MEMELINK, 2000). Diante deste quadro, e também diante do fato que uma única planta poder conter várias substâncias químicas diferentes, percebe-se a riqueza de entidades moleculares novas contidas no reino vegetal que ainda podem ser descobertas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

## **1.2 A espécie *Lychnophora ericoides*, uma planta medicinal endêmica no Brasil**

Apesar do extenso emprego pelas populações, relativamente poucas plantas medicinais foram avaliadas científica e clinicamente para comprovar sua eficácia, benefícios potenciais e efetividade (CALIXTO, 2000; STICHER, 1993). Diversos fatores podem

explicar a razão desta discrepância. Quando comparados com fármacos sintéticos, os medicamentos vegetais exibem algumas diferenças marcantes, como: os princípios ativos são freqüentemente desconhecidos; a padronização, estabilidade e controle de qualidade, embora realizáveis, são de execução relativamente complicadas; a disponibilidade e a qualidade da matéria-prima vegetal são questões problemáticas; são raros os estudos clínicos e toxicológicos duplo-cegos bem definidos para comprovar a eficácia e segurança (CALIXTO, 2000). Estes fatos evidenciam a complexidade da tarefa de desenvolver, a partir de plantas medicinais, produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis, como se exige dos demais medicamentos. O estudo de determinada espécie vegetal com fins medicinais deve compreender a realização de pesquisas botânicas, farmacognósticas, químicas, farmacológicas e toxicológicas, e este trabalho multidisciplinar deve concluir se a espécie em questão está bem caracterizada morfológica e quimicamente e se sua ação será eficaz e segura quando administrada em doses corretas (CALIXTO, 2000). Até o momento poucas preparações vegetais foram objeto de estudos clínicos, como por exemplo os extratos de *Hypericum perforatum* (erva de São João) e de *Ginkgo biloba* (ginco) (ILIEVA et al., 2004). Apesar de demonstrarem que estes dois vegetais são seguros e desprovidos de efeitos colaterais sérios, suas eficácias clínicas ainda necessitam de estudos duplo-cegos bem estabelecidos. Este quadro revela, claramente, a grande lacuna existente entre uma planta medicinal ter seu uso consagrado e a rigorosa comprovação científica de sua eficácia e segurança, comprovadas segundo normas de qualidade internacionais.

No Brasil a utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos provém de diferentes origens e culturas, principalmente de índios, seitas afro-brasileiras e da tradição européia. O uso e o comércio destes recursos decorrem de diversos fatores. Em um primeiro momento, além do fator cultural e religioso, as plantas medicinais coletadas no campo eram (e muitas ainda são) mais acessíveis à grande parcela da população desprovida de poder

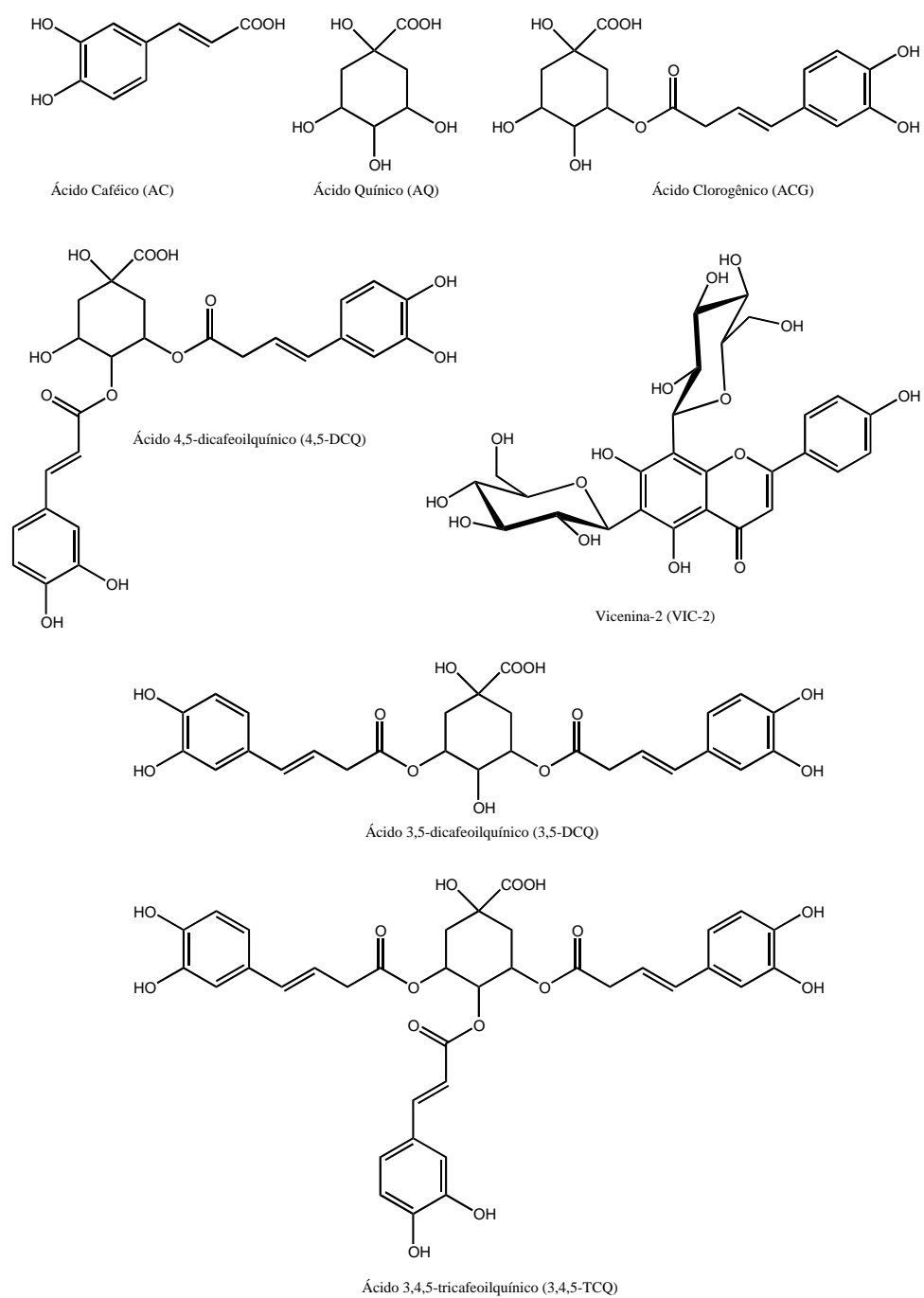
aquisitivo para adquirir medicamentos industrializados. Além deste fato, nota-se atualmente uma tendência mundial em buscar terapias ditas “naturais”, cuja principal vantagem é a ausência ou a redução (muitas vezes equivocada) de eventos adversos. Apesar de a flora brasileira conter inúmeras plantas medicinais, a maioria dos fitoterápicos comercializada no Brasil é produzida a partir de plantas introduzidas. Basicamente, duas razões principais poderiam explicar este fato. Em primeiro lugar, até 1996 o Brasil não possuía uma lei de patentes (BRASIL, 1996), o que desmotivou as indústrias nacionais a investir em pesquisa e desenvolvimento de medicamentos, incluindo os fitoterápicos. O segundo fator, que de certa forma é uma consequência do primeiro, é que a imensa maioria das indústrias farmacêuticas nacionais não investiu em desenvolvimento tecnológico, e assim não possui estrutura para realizar estudos que garantam a eficácia e a segurança deste tipo de medicamento, fundamentais para o registro junto aos órgãos reguladores (BRASIL, 2004). Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e constituem um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (PINTO et al., 2002).

O gênero *Lychnophora*, pertencente à família Asteraceae (ROBINSON, 1999), é endêmico no Brasil e apresenta uma distribuição restrita ao cerrado brasileiro, ocorrendo nos complexos de vegetação rupestre de quartzito da Bahia, Goiás, Tocantins e Minas Gerais (SEMIR, 1991). Estudos fitoquímicos demonstraram que o gênero acumula triterpenóides, derivados do cariofileno e  $\alpha$ -humuleno, lactonas sesquiterpênicas (LSTs), lignanas, fenilpropanóides (ácidos cafeoilquínicos) e flavonóides (BAZON et al., 1997; BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; CUNHA, 1994; GOBBO-NETO, 2002; GRAEL, 2003; JORDÃO, 2003; SANTOS, 2002). A Figura 2 mostra as estruturas químicas de polifenóis isolados de frações polares de *Lychnophora* (excetuando-se o ácido quínico), os quais foram objeto deste estudo. Embora, até o momento, espécies do gênero *Lychnophora* não sejam

utilizadas na produção de medicamentos registrados, algumas delas são freqüentemente utilizadas na medicina popular.

Devido ao seu amplo uso pela população pode-se afirmar que *L. ericoides* Mart. (arnica da serra ou falsa arnica) é a espécie mais comercializada do gênero. Pequenas empresas vendem extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de suas folhas, inflorescências e raízes para fins analgésicos, antiinflamatórios e cicatrizantes (BORSATO et al., 2000; LOPES, 2001; SANTOS et al., 2005a), entretanto desconhece-se qualquer tipo de registro nos órgãos competentes. O uso intensivo desta espécie pela medicina popular, a qual é extraída em larga escala de seu habitat, e a rápida destruição do cerrado fez com que *L. ericoides* passasse a constar na lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (BRASIL, 1992).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa iniciou estudos farmacológicos com a espécie *L. ericoides* (Figura 3). Os resultados obtidos até o momento fornecem fundamentos parciais ao uso popular da planta e, portanto, ensaios complementares devem ser realizados. Foram verificadas, em modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos, as atividades analgésicas das lignanas cubebina e metil-cubebina extraídas do extrato de média polaridade (diclorometânico) das raízes do vegetal (BORSATO et al., 2000). Flausino et al. (2000) isolaram a lactona sesquiterpênica (LST) centraterina a partir do extrato de lavagem das folhas com diclorometano e Santos (2000) isolou a LST goiasensolido de cultura de calos. A literatura relata que estas duas LSTs apresentam atividade antiinflamatória *in vitro*, estando entre as mais potentes na inibição do fator transcricional central da inflamação, o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (RÜNGLER et al., 1999).



**Figura 2.** Estruturas químicas dos polifenóis isolados de frações polares de *Lychnophora* (excetuando-se o ácido quínico) avaliados neste estudo.



**Figura 3.** *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). A, indivíduo adulto no habitat natural; B, flor. (Fotos: Norberto P. Lopes; Leonardo Gobbo-Neto).

Por outro lado, foi descrito que estas substâncias apresentam potente ação alergênica (PICMAN, 1986). Além disso, Brigagão, Lopes e Colepicolo (2004) demonstraram recentemente que LSTs do tipo furanoeliangolido promovem a depleção dos níveis intracelulares de glutathione, o que caracteriza um efeito tóxico potencial. Estudos de relação estrutura-atividade demonstraram que o grupo metileno exocíclico conjugado com a carbonila lactônica das LSTs está associado à atividade citotóxica. Porém, este grupo é imprescindível para as diversas atividades biológicas que estas micromoléculas exercem pois o mecanismo de ação é inespecífico: reação (adição tipo Michael) com grupos sulfidril de biomoléculas com desativação de moléculas funcionalmente essenciais (enzimas e peptídeos). Assim, as doses tóxica e efetiva são bastante próximas (SCHMIDT, 1999).

Uma vez que a medicina popular emprega a *L. ericoides* na forma de extratos alcoólicos e hidroalcoólicos (LOPES, 2001; SANTOS et al., 2005a), nossa atenção voltou-se para extratos mais polares do vegetal. O estudo químico das frações aquosa e butanólica das folhas, previamente lavadas com diclorometano para retirada de LSTs presentes nos tricomas glandulares, levou ao isolamento de ácidos cafeoilquínicos, glicosídeos e de vários flavonóides, sendo duas flavonas di-C-glicosiladas (GOBBO-NETO, 2002; GOBBO-NETO



et al., 2005). A fração aquosa do extrato polar das folhas (LEFA), a qual continha as flavonas, foi avaliada posteriormente em ensaio de edema de pata em ratos a fim de verificar uma possível atividade antiinflamatória. Os resultados obtidos mostram que a LEFA é ativa nas concentrações de 100 e 200 mg/kg. A flavona vicenina-2 (VIC-2), presente nesta fração, também se mostrou ativa no mesmo ensaio nas doses 15 e 90 mg/kg (GOBBO-NETO et al., 2005). Além do estudo químico e farmacológico das folhas do vegetal, o estudo fitoquímico da fração *n*-butanólica do extrato polar das raízes (LERB) resultou no isolamento de uma saponina bisdesmosídica (chikusetsusaponina IVa), dos ácidos 3,5-di-*O-E*-cafeoilquínico (3,5-DCQ), 4,5-di-*O-E*-cafeoilquínico (4,5-DCQ) e 3,4,5-tri-*O-E*-cafeoilquínico (3,4,5-TCQ) (SANTOS, 2002; SANTOS et al., 2005a). A fim de avaliar a atividade analgésica destes derivados, foram realizados ensaios de inibição de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. Tanto a LERB como os ácidos 3,5-DCQ e 4,5-DCQ, extraídos desta fração, foram capazes de reduzir as contorções nos animais (SANTOS et al., 2005a).

Apesar destes dados comprovarem cientificamente as atividades analgésica e antiinflamatória de frações e metabólitos secundários de *L. ericoides*, e fornecerem fundamento ao seu uso popular, é necessário ainda realizar outros ensaios biológicos e farmacológicos visando esclarecer como essas substâncias atuam. Através do emprego de outros modelos experimentais de inflamação e dor, tanto *in vivo* como *in vitro*, dados adicionais sobre as frações e substâncias ativas isoladas de *L. ericoides* poderão ser obtidos. Estes dados fornecerão maiores detalhes sobre a ação analgésica e antiinflamatória da planta, o que posteriormente poderá ser utilizado para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico padronizado, ou talvez para o isolamento das substâncias mais ativas a serem empregadas como fármacos na terapia.

### 1.3 Uma visão geral sobre o processo inflamatório

Nossa compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo inflamatório tem aumentado drasticamente, e vem permitindo a descoberta de muitos alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos para tratar doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, alergias, asma e outras. A inflamação está associada a uma vasta gama de mediadores que iniciam este processo, recrutam e ativam outras células para o sítio inflamatório e subseqüentemente resolvem a inflamação (GALLIN et al., 1999; PATWARDHAN; GAUTAM, 2005). Enquanto a produção destes mediadores pode ocorrer nos mais variados tipos celulares, considera-se que os macrófagos são as células iniciadoras primárias da resposta inflamatória (GALLIN et al., 1999). A ciência tem fornecido dados que relacionam um grande número de mediadores inflamatórios [incluindo prostaglandinas (PGs), cininas, fator de agregação plaquetária, leucotrienos (LTs), aminas, purinas, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão] à ação em alvos específicos (por exemplo, a microvasculatura), levando à liberação local de outros mediadores de leucócitos (por exemplo, mastócitos e basófilos) e células endoteliais, com conseqüente indução de moléculas de adesão e migração celular para o foco inflamatório (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Geralmente, os mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória podem ser divididos em duas grandes classes: metabólitos do ácido araquidônico (AA) e citocinas. Produtos originados do metabolismo do AA incluem PGs e tromboxanos (via das cicloxigenases) e LTs (via da lipoxigenase). Substâncias como o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), representativos destas duas vias, podem, respectivamente, iniciar o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e provocar mudanças no tônus vascular e fluxo sanguíneo (McMAHON; KOLTZENBURG, 2005).

PGs são pequenas moléculas lipídicas que regulam inúmeros processos no organismo, incluindo função renal, agregação plaquetária, liberação de neurotransmissores e modulação da função imune (HARRIS et al., 2002). A produção de PGs é iniciada com a liberação de AA de fosfolípidios de membrana pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) em resposta ao estímulo inflamatório. O AA é convertido em prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) pelas enzimas cicloxigenase 1 (COX-1) e cicloxigenase 2 (COX-2), também conhecidas como prostaglandina endoperóxido H sintase. Em geral, COX-1 é expressa constitutivamente na maioria dos tecidos do organismo e atua para manter processos homeostáticos, como a secreção ácida gástrica. A COX-2, ao contrário, é uma enzima induzível e está envolvida principalmente na regulação de processos inflamatórios (HARRIS et al., 2002). Prostaglandina sintases de células específicas convertem PGH<sub>2</sub> em uma série de prostaglandinas, incluindo PGI<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>. A PGE<sub>2</sub> é extremamente importante em processos inflamatórios, sendo uma das PGs mais conhecidas e mais bem estudadas (DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) situam-se entre os agentes terapêuticos mais amplamente empregados para o tratamento de dor, febre e inflamação. Vane, Samuelson e Bergstrom demonstraram que estas substâncias antiinflamatórias, cujo representante principal é o AAS, têm a capacidade de bloquear a síntese de PGs (DANNHARDT; KIEFER, 2001). Uma vez demonstrado que os AINES exercem seus efeitos através da inibição da síntese de PGs via interação com a enzima COX (VANE, 1971), um grande número de modelos celulares tem sido desenvolvidos para estudar interações de fármacos com o metabolismo do AA e também para realizar uma avaliação preliminar em uma etapa inicial da pesquisa de fármacos antiinflamatórios (TORDJMAN et al., 1995). Além disso, a descoberta de poderosas ferramentas da biologia molecular possibilitou o estudo das enzimas envolvidas no processo inflamatório. Estes estudos são capazes de avaliar o nível de expressão destas enzimas como, por exemplo, COX-2, ou das vias sinalizadoras ativadas após

um estímulo específico. Conseqüentemente, estes avanços geraram a proliferação de estudos sobre o papel de várias enzimas e citocinas inflamatórias. A maioria destes estudos têm sido conduzidos em linhagens celulares *in vitro*, e os resultados nem sempre são confirmados por estudos *in vivo* (CIRINO, 1998).

Além das PGs, o processo inflamatório é acompanhado pela liberação de diversas citocinas, moléculas solúveis que atuam como mediadores locais nas interações célula-célula. As citocinas são peptídeos regulatórios que são produzidos potencialmente por todas as células, e somente algumas delas são constitutivamente expressas, como o fator de necrose tumoral (TNF) em mastócitos (MAURER et al., 2003; para revisão ver Thomson; Lotze, 2003). Na presença de estímulos apropriados, por exemplo lipopolissacarídeo de bactérias Gram-negativas (LPS), a expressão gênica destas moléculas aumenta e conseqüentemente a produção de citocinas ocorre, o que leva à iniciação e amplificação da resposta inflamatória. As duas principais citocinas envolvidas na iniciação desta resposta são o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1). Estas proteínas possuem múltiplos sítios de ação e suas respostas podem incluir a indução da síntese de outras citocinas, síntese de moléculas de adesão, ativação do metabolismo do AA, indução da resposta de fase aguda e *priming* (ativação) de PMN (THOMSON; LOTZE, 2003). O TNF modula células linfóides e não linfóides a sintetizar e liberar citocinas imunoestimulatórias, como IL-1 e interleucina-6 (IL-6). A regulação da expressão gênica destas citocinas ocorre em parte pela ativação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e proteína ativadora-1 (THOMSON; LOTZE, 2003). Antes da ativação, o complexo NF- $\kappa$ B inativado situa-se no citoplasma, uma vez que ele está associado a uma subunidade inibitória, o I- $\kappa$ B. A ativação do NF- $\kappa$ B e posterior migração deste para o núcleo celular ocorre com a fosforilação do I- $\kappa$ B (PLUMMER et al., 1999).

Em sua revisão sobre inibidores naturais da produção, secreção e função do TNF- $\alpha$ , Habtemariam (2000) apresenta alguns compostos, dentre eles vários flavonóides, LSTs e polifenóis, que atuam em processos bioquímicos regulados por esta citocina. O autor considera que somente uma minoria de compostos antiinflamatórios naturais atue na etapa pós-translacional da produção/função do TNF- $\alpha$ . O artigo mostra ainda que a maioria dos metabólitos secundários age através da supressão da ativação do NF- $\kappa$ B (HABTEMARIAM, 2000).

#### **1.4 Ensaios *in vitro* para a avaliação do efeito de fármacos e a linhagem celular U-937**

No campo do desenvolvimento farmacêutico, os pesquisadores enfrentam um paradoxo: descobrir novos compostos ativos e garantir segurança ao paciente mas, ao mesmo tempo, minimizar o número de animais empregados na experimentação (CASTELL; GÓMEZ-LECHÓN, 1996; LAMBERT et al., 2005; PARK et al., 2004). Atualmente, o emprego de animais na pesquisa científica é um tema polêmico, principalmente na Europa. Entidades protetoras exercem forte pressão sobre as autoridades governamentais para que estas adotem medidas que proíbam, ou ao menos restrinjam, o uso de animais experimentais pela comunidade científica (FITZPATRICK, 2003; SAUER, 2004). Dentro deste contexto, modelos *in vitro* de avaliação de fármacos vêm se tornando cada vez mais relevantes. Estes modelos apresentam várias vantagens, podendo ser empregados tanto para o *screening*

(avaliação preliminar), em uma etapa inicial da pesquisa, como para explorar os mecanismos de ação de fármacos (CASTELL; GÓMEZ-LECHÓN, 1996; LAMBERT et al., 2005).

Modelos *in vitro* oferecem uma vantagem importante quando se deseja estudar metabólitos secundários: estes ensaios, quando comparados aos estudos *in vivo*, necessitam de pequenas quantidades da substância a ser testada, o que é muito importante em situações nas quais a produção do metabólito é baixa ou o organismo produtor corre risco de extinção. Além disso, os experimentos são relativamente simples e rápidos de executar e podem fornecer informações científicas valiosas em estágios iniciais de desenvolvimento de um fármaco, a um custo razoável. Modelos *in vitro*, entretanto, constituem uma simplificação de um organismo animal mais complexo (CASTELL; GÓMEZ-LECHÓN, 1996). Percebe-se, portanto, que modelos *in vivo* e *in vitro* devem ser empregados de forma a fornecer informações complementares um ao outro, explorando-se sempre as vantagens que cada um venha a oferecer (LAMBERT et al., 2005; PARK et al., 2004).

O desenvolvimento de modelos celulares experimentais para o estudo da leucemia humana possibilitou aos cientistas uma melhor compreensão deste estado patológico. Ao mesmo tempo, estes modelos tornaram-se uma ferramenta de pesquisa poderosa pois permitem avaliar a produção de citocinas e o efeito de modificadores biológicos (drogas e fármacos, por exemplo) sobre estas células. As linhagens celulares humanas HL-60 e U-937 constituem um exemplo desta abordagem (HARRIS; RALPH, 1985; HEISKE et al., 2003; SACHA et al., 2005).

Especificamente, HL-60 e U-937 são linhagens de origem leucêmica, derivados neoplásicos das células progenitoras de granulócitos e monócitos, respectivamente. As células U-937, quando não induzidas, são majoritariamente desprovidas de capacidade fagocítica e produzem  $H_2O_2$  e  $O_2^-$  em baixas quantidades. Além disso, a capacidade de matar microrganismos e células tumorais está ausente (PUSHKAREVA et al., 2000; RALPH et al.,

1982). Por outro lado, vários agentes químicos e biológicos, como o ácido retinóico (BOTLING et al., 1996; OLSSON; BREITMAN, 1982; PUSHKAREVA et al., 2000), derivados da vitamina D (BOTLING et al., 1996; DODD et al., 1983), citocinas (GLASOW et al., 2005; HARRIS et al., 1985) e ésteres de forbol são capazes de promover a maturação (ou diferenciação) destas células. O agente químico 12-*O*-tetradecanoilforbol 13-acetato (PMA), reconhecidamente um ativador de proteína quinase C, é capaz de induzir a diferenciação das células U-937 (KITAMURA et al., 2004). A diferenciação induzida pelo PMA provoca mudanças morfológicas, como expansão do corpo celular, interrupção da proliferação e apresentação de antígenos, os quais são fenótipos característicos de macrófagos (KITAMURA et al., 2004). Sob condições normais, as células U-937 são cultiváveis em suspensão (meios de cultura líquido) e apresentam um aspecto arredondado. Após o tratamento com PMA, elas se tornam aderentes umas às outras, formam aglomerados e apresentam pseudópodes (HOSOYA; MARUNOUCHI, 1992).

Dentre vários outros agentes, o LPS é a molécula bacteriana sinalizadora mais potente e melhor caracterizada (HASHIMOTO et al., 2003; PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004). O complexo formado pelo LPS e pela proteína CD14 (ligante de LPS) é reconhecido pelo receptor *Toll-like 4* de monócitos/macrófagos e neutrófilos (QURESHI et al., 1999; YANG et al., 1998). Este complexo ativa segundos mensageiros e rotas de transdução de sinais os quais, por sua vez, ativam vários fatores de transcrição, principalmente o NF- $\kappa$ B. Como resultado deste processo, o LPS desencadeia uma série de reações celulares, incluindo a produção de citocinas e quimiocinas, a liberação de metabólitos do AA e a geração de intermediários de oxigênio e nitrogênio, que conjuntamente são responsáveis por reações patofisiológicas (KARIMA et al., 1999). Mais especificamente, a resposta das células imunes à presença de LPS inclui a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e interferon- $\beta$  (PALSSON-MCDERMOTT; O'NEILL, 2004). Além destas citocinas, o LPS

também promove a liberação de PGE<sub>2</sub>, proteína inflamatória de macrófagos 2 (MIP-2), proteína quimioatraente de monócitos (MCP) e quantidades excessivas de óxido nítrico (ILIEVA et al., 2004).

## **1.5 A importância dos estudos de metabolismo no processo de desenvolvimento de medicamentos**

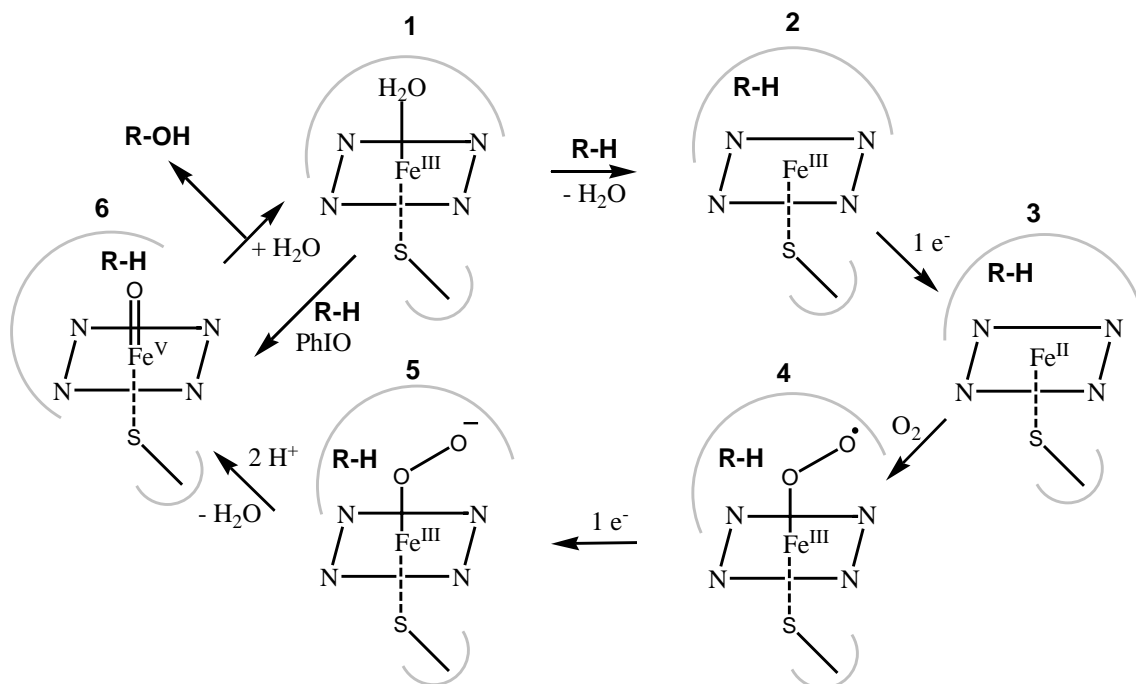
Para produzir seus efeitos característicos, um fármaco precisa estar presente em concentrações adequadas nos seus locais de ação. Embora dependam naturalmente da quantidade administrada, as concentrações atingidas também são função do grau e da taxa de absorção, distribuição, ligação ou localização dos tecidos-alvo, biotransformação e excreção do fármaco (BENET; KROETZ; SHEINER, 1996; JACKSON; ROBBIE; MARROUM, 2004). A biotransformação de fármacos, drogas e outros agentes xenobióticos é essencial para o término de sua atividade biológica e para a eliminação destes compostos do organismo. Além disso, os metabólitos formados podem contribuir de forma única para a eficácia terapêutica, toxicidade e interações droga-droga (GUENGERICH, 2005). Desse modo, as razões de formação e eliminação de cada metabólito são parâmetros cruciais do perfil terapêutico de novos fármacos (ATKINS, 2004). Geralmente, as reações de metabolização levam a metabólitos inativos mais polares, facilitando assim o processo de excreção do organismo (GRANT, 2005). Em alguns casos pode ocorrer também a geração de metabólitos mais tóxicos ou mais ativos que o fármaco de origem (BENET; KROETZ; SHEINER, 1996; TODAKA et al., 2005; TOWNSEND et al., 2003).



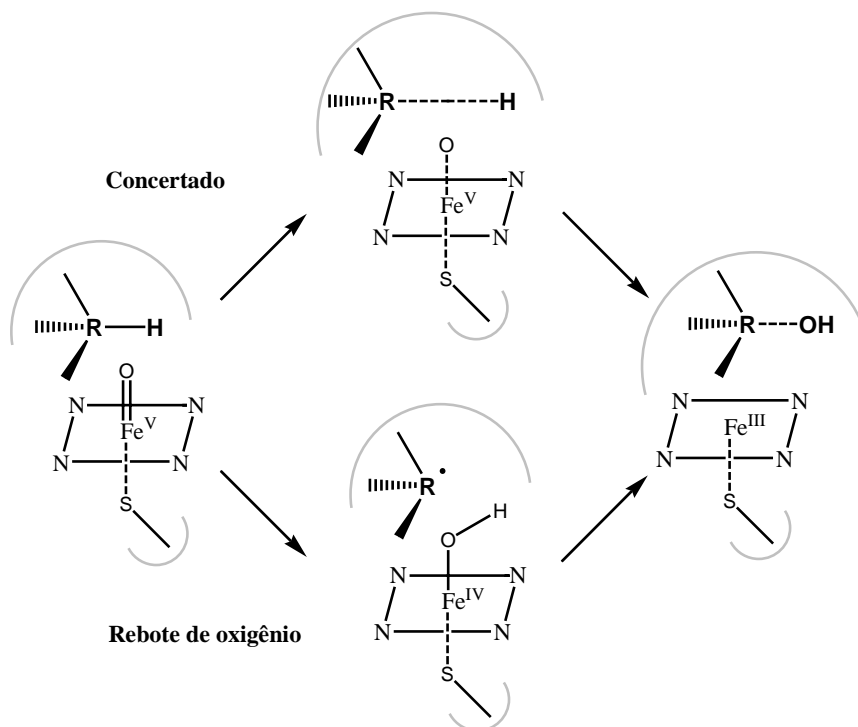
O processo de metabolismo de drogas envolve uma variedade de reações bioquímicas sequenciais, divididas em reações de funcionalização de fase I e reações biossintéticas de fase II. Reações de fase I incluem oxidação, redução e hidrólise, e introduzem ou expõem um grupo funcional no composto original. Geralmente as reações de fase I resultam na perda da atividade farmacológica. Reações de fase II compreendem glicuronidação, sulfatação, acetilação e metilação, formando-se uma ligação covalente entre um grupo funcional do composto original e o ácido glicurônico, sulfato, glutatona, aminoácidos ou acetato (GRANT, 2005; JOSEPHY; GUENGERICH; MINERS, 2005). Embora qualquer tecido do organismo apresente alguma atividade metabólica, o fígado é o principal local de metabolização de drogas. Outros órgãos com capacidade biotransformadora considerável são os rins, a pele, os pulmões e o trato gastrointestinal, principalmente os enterócitos do epitélio do intestino delgado (THUMMEL; KUNZE; SHEN 1997). O processo de biotransformação de drogas em metabólitos tem caráter essencialmente enzimático, sendo que a família de enzimas do citocromo P450 (P450) constitui-se no principal sistema catalisador destas reações (COON, 2005; DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997). As monoxigenases do P450 são as hemeoproteínas mais exploradas e também mais conhecidas por seu papel no metabolismo de compostos de caráter relativamente polar (ZUBER; ANZENBACHEROVÁ; ANZENBACHER, 2002). Até o ano de 2003, mais de 2000 membros desta família de enzimas tinham sido descritos na literatura. Além de seu papel no metabolismo de xenobióticos, as P450 presentes em tecidos de mamíferos participam da síntese de hormônios esteróides, do metabolismo de vitaminas lipossolúveis e da conversão de ácidos graxos poliinsaturados em moléculas biologicamente ativas (ESTABROOK, 2003). As enzimas do P450 catalisam, sob condições fisiológicas, a monoxigenação de uma grande variedade de substratos orgânicos através do uso de oxigênio molecular e o consumo estequiométrico de dois elétrons e dois prótons provenientes do NADPH, na presença da flavoproteína citocromo P450 redutase (P450<sub>red</sub>) (PORTER, 2004).

Dentre as várias reações atribuídas ao P450 estão a hidroxilação de ligações C-H saturadas, a epoxidação de duplas ligações, a oxidação de heteroátomos, reações de desalquilação, oxidações de aromáticos, dentre outras (MEUNIER; BERNADOU, 2002). A Figura 4 mostra um esquema de como ocorre a formação do intermediário reativo e a conseqüente oxidação do substrato (R-H). Inicialmente, R-H aproxima-se do sítio catalítico da enzima (representado por semicírculos cinza na figura) deslocando o estado de equilíbrio energético do centro Fe(III) para um nível de *spin* mais elevado. A entrada de R-H no sítio catalítico expulsa a molécula de H<sub>2</sub>O (o sexto ligante do octaedro) e outras moléculas de H<sub>2</sub>O que estejam próximas (etapa 1 para 2). A seguir, a forma oxidada do P450 [P450-Fe(III)] recebe um elétron do NADPH (via P450<sub>red</sub>) levando à formação do complexo reduzido P450-Fe(II) (etapa 2 para 3). O P450-Fe(II) reage então com O<sub>2</sub> (etapa 3 para 4) e, após a entrada de mais um elétron do NADPH (também originário da P450<sub>red</sub>), forma-se o nucleófilo estável P450-Fe(III)-O-O<sup>-</sup> (etapa 4 para 5). A seguir, o Fe(III) transfere um par eletrônico para o O levando à saída de H<sub>2</sub>O e à formação da espécie Fe(V)=O (ligação dupla entre Fe e O) (etapa 5 para 6). Ao final, o outro átomo de oxigênio é transferido para o R-H, havendo regeneração da enzima e início de novo ciclo catalítico (etapa 6 para 1) (COON, 2005; BENET; KROETZ; SHEINER, 1996; MEUNIER; BERNADOU, 2002).

Dois mecanismos foram propostos para a hidroxilação de ligações C-H alifáticas pelo P450, as quais dependem da natureza do substrato e da própria enzima: o mecanismo que envolve a formação de um radical no interior da gaiola de solvente (mecanismo de recombinação de oxigênio, *oxygen rebound*) (GROVES, 2000) e o mecanismo concertado sem a formação de radical (ATKINSON; INGOLD, 1993; TOY; NEWCOMB; HOLLENBERG, 1998). Estes mecanismos estão representados na Figura 5, a qual contém um maior detalhamento da etapa 6 para 1 da Figura 4.



**Figura 4.** Representação esquemática dos possíveis intermediários do ciclo catalítico do P450. Os semicírculos em cinza representam a proteína ao redor do sítio ativo. Adaptado de Meunier e Bernadou, 2002.



**Figura 5.** Prováveis mecanismos de reação de hidroxilação catalisados por enzimas do P450: mecanismo concertado e mecanismo de recombinação de oxigênio (*oxygen rebound*). Adaptado de Atkinson e Ingold (1993) e Toy, Newcomb e Hollenberg (1998).

## **1.6 Metaloporfirinas sintéticas como modelo para o estudo de metabolismo de fármacos**

Os estudos *in vivo* de metabolismo de drogas envolvem a análise de metabólitos presentes no sangue, na urina e nas fezes de animais e humanos (LIM; LORD, 2002). Além desta abordagem, avaliações preliminares do processo metabólico têm sido realizadas *in vitro* empregando-se hepatócitos ou preparações mitocondriais e microsossomais de fígado (KATO et al., 2002). Esta abordagem *in vitro* fornece uma boa indicação inicial do destino metabólico de uma substância e vem sendo amplamente utilizada (LIM; LORD, 2002). Entretanto, Chorghade et al. (1996) apontam algumas dificuldades e problemas associados ao uso de sistemas biológicos para estudos de metabolismo, sejam eles realizados com animais experimentais inteiros ou órgãos isolados. Dentre estes se destacam: (i) estudos com organismos vivos e preparações teciduais produzem pouca quantidade de metabólitos os quais, por serem muitas vezes hidrofílicos, são de difícil isolamento; (ii) estudos com animais requerem o sacrifício destes e são relativamente caros; (iii) preparações de tecido hepático possuem potência variável, sendo complicado quantificar precisamente a estequiometria do oxidante; (iv) geralmente não se sabe, previamente, as estruturas químicas dos metabólitos que se deve procurar; (v) muitos metabólitos são difíceis de serem sintetizados por rotas convencionais. Além das dificuldades apresentadas acima, o emprego de animais na pesquisa científica é um tema bastante polêmico, como já discutido.

Dentro desse contexto, metaloporfirinas (MeP) sintéticas vem despertando o interesse de vários grupos de pesquisa por serem capazes de mimetizar processos metabólicos *in vivo* que são catalisados por hemeoproteínas (BERNADOU; MEUNIER, 2004; MEUNIER; BERNADOU, 2002; TRAYLOR, 1991). Algumas vantagens apresentadas por estes sistemas

biomiméticos, puramente químicos, podem ser citadas: (i) os metabólitos podem ser obtidos em quantidades relativamente grandes e assim auxiliar a identificação dos metabólitos originados *in vivo*; (ii) conforme as quantidades obtidas, os metabólitos gerados podem ser empregados em testes farmacológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*; (iii) metabólitos instáveis podem ser identificados e algumas vezes isolados sob condições de reação controladas; (iv) o número de animais experimentais pode ser bastante reduzido (BALOGH; KESERU, 2004; HIGUCHI; HIROBE, 1996).

Assim como ocorre para as hemeoproteínas do P450, espécies metal-oxo de alta valência são os intermediários-chave do ciclo catalítico das MeP. Recentemente, cálculos de teoria de densidade funcional forneceram algumas pistas sobre a natureza exata destas espécies e de suas reatividades (MEUNIER; BERNADOU, 2002). Vários agentes oxidantes têm sido empregados como doadores de oxigênio nas reações catalisadas por MeP, como por exemplo iodosilbenzeno (PhIO), peroxiácidos, hipocloritos, cloretos, hidroperóxidos, N-óxidos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dentre outros. PhIO foi um dos primeiros oxidantes utilizados por apresentar apenas um átomo de oxigênio e, assim, seu mecanismo é mais facilmente compreendido em comparação com outros oxidantes (MONTANARI; CASELLA, 1994). Em geral, a espécie ativa nas oxidações por MeP é a espécie metal-oxo de alta valência gerada pela reação do complexo metal(III) porfirina com o átomo de oxigênio do oxidante (por exemplo, o PhIO), mimetizando o “ciclo curto do P450”. As etapas 6 para 1 e 1 para 6 da Figura 4 representam este processo.

Quanto às aplicações, as MeP vem sendo extensivamente estudadas como catalisadores nas reações de oxidação de compostos simples, como alcanos e alcenos (DOLPHIN; TRAYLOR; XIE, 1997; GROVES; NEMO, 1983; IAMAMOTO et al., 1995; IAMAMOTO et al., 1996; MEUNIER, 1992; SACCO; IAMAMOTO, LINDSAY-SMITH, 2001; VINHADO et al., 2001). Por outro lado, existem relativamente poucos trabalhos na literatura

que abordem a oxidação de drogas e fármacos por estes sistemas biomiméticos. Alguns exemplos incluem praziquantel (MELO et al., 2005), lidocaína, odapipam, ABT-200, ABT-418 e aminopirina (CARRIER; BATTIONI; MANSUY, 1993; CHORGHAE et al., 1996), acetaminofeno (BERNADOU et al., 1991; VIDAL et al., 1993), denaverina (SMOLINKA; GOBER, 1999), dentre outros (BALOGH; KESERU, 2004).

Apesar do Brasil possuir vários grupos que estudam o metabolismo de fármacos, um enfoque de pesquisa pouco comum é dado sobre estudos de metabolismo de produtos naturais extraídos de plantas medicinais. Os estudos de metabolismo de um novo fármaco em potencial, independentemente da origem deste fármaco, possuem um papel importante nos processos de desenvolvimento e descoberta de um novo medicamento (OLIVEIRA; WATSON, 2000). De acordo com Fernandez-Metzler et al. (1999), a caracterização de metabólitos saiu dos estágios finais do desenvolvimento de fármacos para se tornar um componente integral dos estágios iniciais de pesquisa, fornecendo subsídios para o desenvolvimento posterior de um agente terapêutico. Em alguns casos, os produtos de metabolismo de dada substância podem ser farmacologicamente até mais ativos ou mais tóxicos que a substância que os originou. Nesse sentido, a caracterização dos metabólitos principais e ativos auxilia na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos candidatos com atividade farmacológica otimizada, estabilidade metabólica e perfil toxicológico (LIM; LORD, 2002). Por fim, de acordo com Alavijeh e Palmer (2004), a determinação do perfil farmacocinético (metabolismo) de um fármaco constitui o principal obstáculo da pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, sendo que esta etapa do processo é responsável por aproximadamente 40% das rejeições de medicamentos que não são aprovados para uso terapêutico.

## 1.7 O emprego de técnicas hífenadas em estudos de metabolismo de fármacos

Atualmente, o emprego de técnicas hífenadas (ou combinadas) constitui-se em uma ferramenta poderosa para o estudo de metabolismo de fármacos. O termo “hifenação” foi proposto inicialmente por Hirschfeld em 1980 (HIRSCHFELD, 1980), embora a idéia de acoplar ferramentas analíticas tenha surgido anteriormente a este período (EDWARDS; THOMAS-OATES, 2005). Por hifenação entende-se a combinação física e em tempo real de técnicas de separação cromatográficas (cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC; cromatografia gasosa, GC) com detectores espectroscópicos (ultravioleta, UV; infravermelho, IR; ressonância magnética nuclear, RMN) e espectrométricos (espectrometria de massas, MS; espectrometria de massas acoplada MS-MS) com o objetivo de obter informação estrutural de substâncias presentes em misturas complexas. Particularmente, o desenvolvimento de novas interfaces e também de técnicas brandas de ionização da amostra solucionaram os vários problemas de incompatibilidade entre o cromatógrafo líquido e o espectrômetro de massas, provocando uma revolução tanto na academia quanto na indústria. Dessa forma, o acoplamento da HPLC à MS, ao diminuir os estágios de preparação da amostra, permite analisar rapidamente o perfil metabólico da substância analisada em resposta às novas estratégias de descoberta de fármacos, tornando-se atualmente um método de rotina em estudos de metabolismo (OLIVEIRA; WATSON, 2000). Lim e Lord (2002) argumentam que, provavelmente, a aplicação mais ampla de HPLC-MS com ionização por *electrospray* (ESI) ocorre na análise de compostos como fármacos e metabólitos em matrizes biológicas complexas. Além disso, o desenvolvimento e emprego das técnicas de ionização por desorção a laser com auxílio de matriz (MALDI) e por ESI no início dos anos 90 possibilitou

a análise de moléculas termolábeis, complexos organometálicos e moléculas de elevada massa molecular, incluindo polímeros e proteínas (GELPI, 1995; SMITH et al., 1991). Estas técnicas permitem também analisar moléculas polares sem a necessidade de derivatização (OLIVEIRA; WATSON, 2000).



## 2 OBJETIVOS

Uma vez que a espécie *Lychnophora ericoides* Mart. é empregada na medicina tradicional para o tratamento de dor e inflamação;

Uma vez que resultados preliminares mostram que os extratos da planta são ativos em modelos experimentais de dor e inflamação;

E uma vez que não há relatos na literatura sobre o metabolismo oxidativo dos compostos ativos do vegetal, os objetivos desta tese são:

### 2.1 Objetivos gerais

1) Avaliar os efeitos de frações polares de *Lychnophora ericoides* e ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico) em ensaios farmacológicos *in vivo* (atividades analgésica, antiinflamatória e antitérmica).

2) Avaliar o efeito de substâncias isoladas de *Lychnophora* sobre a produção de mediadores inflamatórios por células cultivadas *in vitro*.

3) Estudar o metabolismo oxidativo dos ácidos cafeoilquínicos através de reações com metaloporfirinas sintéticas e com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

1) Reisolhar os ácidos cafeoilquínicos da fração *n*-butanólica das raízes de *L. ericoides*.

2) Avaliar o efeito de frações polares de *Lychnophora ericoides* e ácido clorogênico (precursor biossintético dos ácidos di- e tri-cafeoilquínicos) nos ensaios de edema de pata,

contorção abdominal, teste da formalina e febre induzida por LPS em animais experimentais visando fornecer maiores informações a respeito das atividades farmacológicas do vegetal.

3) Avaliar os efeitos da vicenina-2, dos ácidos cafeoilquínicos e suas unidades constituintes, e do produto oxidado do ácido 5-cafeoilquínico sobre a produção de mediadores inflamatórios por células U-937 em cultura a fim de propor os mediadores químicos envolvidos nas atividades farmacológicas de *L. ericoides*.

4) Submeter os ácidos cafeoilquínicos a análises por ESI-MS e ESI-MS-MS e propor as vias de fragmentação visando auxiliar a execução dos passos seguintes.

5) Submeter os ácidos cafeoilquínicos a reações de oxidação empregando-se metaloporfirina sintética (catalisador biomimético).

6) Analisar e identificar, através das técnicas de ESI-MS, ESI-MS-MS, HPLC-ESI-MS e HPLC-ESI-MS-MS, os metabólitos oxidados.

7) Submeter os ácidos cafeoilquínicos à reação de metabolismo com mitocôndrias isoladas de fígado de ratos e comparar os dados obtidos com os dados gerados pela reação de oxidação biomimética.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

\*elaboradas de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023.

AGRAFIOTIS, D. K. On the use of information theory for assessing molecular diversity. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 37, p. 576-580, 1997.

ALAVIJEH, M. S.; PALMER, A. M. The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines. **IDRUGS**, London, v. 7, p. 755-763, 2004.

ALTMAN, F. P. Tetrazolium salts and formazans. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, Stuttgart, v. 9, p. 1-56, 1976.

ASSIS, M. D.; MELO, A. J. B., SERRA, O. A., IAMAMOTO, Y. Study of catalytic of nitro substituted ironporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 97, p. 41-47, 1995.

ATKINS, W. M. Implications of the allosteric kinetics of cytochrome P450s. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 9, p. 478-484, 2004.

ATKINSON, J. F.; INGOLD, K. U. Cytochrome P450 hydroxylation of hydrocarbons: variation in the rate of oxygen rebound using cyclopropyl radical clocks including two new ultrafast probes. **Biochemistry**, Washington, v. 32, p. 9209-9214, 1993.

BAGGIOLINI, M. Chemokines in pathology and medicine. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 250, p. 91-104, 2001.

BAGGIOLINI, M., DEWALD, B., MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. **Advances in Immunology**, San Diego, v. 55, p. 97-179, 1994.

BAGGIOLINI, M.; LOETSCHER, P. Chemokines in inflammation and immunity. **Immunology Today**, Oxford, v. 21, p. 418-420, 2000.

BALOGH, G. T.; KESERU, G. M. Metalloporphyrin mediated biomimetic oxidations: a useful tool for the investigation of cytochrome P450 catalyzed oxidative metabolism **Arkivoc**, Gainesville, v. 7, p. 124-139, 2004.

BAZON, J. N.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J. N. C. Constituents of *Lychnophora brunoides*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 68, p. 92-93, 1997.

BENET, L. Z.; KROETZ, D. L.; SHEINER, L. B. Farmacocinética – a dinâmica da absorção, distribuição e eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 1996. p. 3-20.

BERNADOU, J.; BONNAFOUS, M.; LABAT, G.; LOISEAU, P.; MEUNIER, B. Model systems for metabolism studies - biomimetic oxidation of acetaminophen and ellipticine derivatives with water-soluble metalloporphyrins associated to potassium monopersulfate. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 19, p. 360-365, 1991.

BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Biomimetic chemical catalysts in the oxidative activation of drugs. **Advanced Synthesis & Catalysis**, Weinheim, v. 346, p. 171-184, 2004.

BLATTEIS, C. M.; SEHIC, E. Fever: how may circulating pyrogens signal the brain? **News in Physiological Sciences**, Baltimore, v. 12, p. 1-9, 1997.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, p. 809-813, 2000.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 26, p. 671-676, 1998.

BOTLING, J.; OBERG, F.; TORMA, H.; TUOHIMAA, P.; BLAUER, M.; NILSSON, K. Vitamin D3- and retinoic acid-induced monocytic differentiation: interactions between the endogenous vitamin D3 receptor, retinoic acid receptors, and retinoid X receptors in U-937 cells. **Cell Growth & Differentiation**, Philadelphia, v. 7, p. 1239-1249, 1996.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**. Portaria nº 37-N de abril de 1992. Brasília, 1992.

BRASIL. Lei nº 9.279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 mai. 1996. Seção 1, p. 1.

BRIGAGÃO, M. R. P. L.; LOPES, N. P.; COLEPICOLO, P. Inhibitory mechanism of leukocyte respiratory burst by the sesquiterpene lactone lychnopholide through protein S-glutathionylation decrease. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 36, p. S57-S58, 2004.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds.). **Biochemical toxicology, a practical approach**. Oxford (UK): IRL Press, 1987, p. 217-254.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, p.179-189, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 973-983, 2003.

CARRIER, M. N.; BATTIONI, P.; MANSUY, D. Studying drug metabolic oxidation with biomimetic metalloporphyrin systems - problems and solutions in the case of lidocaine. **Bulletin de la Societe Chimique de France**, Paris, v. 130, p. 405-416, 1993.

CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. (Eds). **In vitro methods in pharmaceutical research**. Amsterdam: Academic Press, 1996. 467 p.

CELIS, J. E.; GROMOV, P.; CABEZÓN, T.; MOREIRA, J. M. A.; AMBARTSUMIAN, N.; SANDELIN, K.; RANK, F.; GROMOVA, I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 3, p. 327-344, 2004.

CHAN, W. C.; HSU, F. L. Inhibition of platelet activation and endothelial cell injury by polyphenolic compounds isolated from *Lonicera japonica* Thumb. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 45, p. 307-312, 1992.

CHAUHAN, S. M. S.; KANDADAI, S. A.; SAHOO, B. Regioselective biomimetic oxidation of etodolac with iodosalicylic acid catalyzed by halogenated and perhalogenated metalloporphyrins in dichloromethane. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 49, p. 1375-1376, 2001.

CHAUNCEY, M. A.; NINOMIYA, S. Metabolic studies with model cytochrome P-450 systems. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 31, p. 5901-5904, 1990.

CHEN, X., OPPENHEIM, J., HOWARD, O.M.Z. Shikonin, a component of anti-inflammatory Chinese herbal medicine, selectively blocks chemokines binding to CC chemokines receptor-1. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 1, p. 229-236, 2001.

CHIANG, Y. M.; CHUANG, D. Y.; WANG, S. Y.; KUO, Y. H.; TSAI, P. W.; SHYUR, L. F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 95, p. 409-419, 2004.

CHICHIRAU, A.; FLUERARU, M.; CHEPELEV, L. L.; WRIGHT, J. S.; WILLMORE, W. G.; DURST, T.; HUSSAIN, H. H.; CHARRON, M. Mechanism of cytotoxicity of catechols and a naphthalenediol in PC12-AC cells: the connection between extracellular autoxidation and molecular electronic structure. **Free Radical Biology & Medicine**, Oxford, v. 38, p. 344-355, 2005.

CHORGHAE, M. S.; HILL, D. R.; LEE, E. C.; PARIZA, R. J. Metalloporphyrins as chemical mimics of cytochrome P-450 enzymes. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 68, p. 753-756, 1996.

CHOUDHURY, R.; SRAI, S. K.; DEBNAN, E.; RICE-EVANS, C. A. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 27, p. 278-286, 1999.

CIRINO, G. Multiple controls in inflammation. Extracellular and intracellular phospholipase A2, inducible and constitutive cyclooxygenase, and inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 55, p. 105-111, 1998.

CLAYSON, D. B.; IVERSON, F.; NERA, E. A.; LOK, E. The significance of induced forestomach tumors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 30, p. 441-463, 1990.

CLIFFORD, M. N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 70, p. 1103-1114, 2004.

COOKE, P. R.; LINDSAY-SMITH, J. R. Alkene epoxidation catalysed by iron(III) and manganese(III) tetraarylporphyrins coordinatively bound to polymer and silica supports. **Journal of Chemical Society Perkin Transactions 1**, Cambridge, v. 14, p. 1913-1923, 1994.

COON, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 45, p. 1-25, 2005.

CORSE, J.; LUNDIN, R. E.; SONDHEIMER, E.; WAISS, A. C. Conformation analysis of D-(-)-quinic acid and some of its derivatives by nuclear magnetic resonance. **Phytochemistry**, Oxford, v. 5, p. 767-776, 1966.

COTELLE, N. Role of flavonoids in oxidative stress. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v.1, p. 569-590, 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 100, p. 72-79, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, p. 52-60, 1997.

CREMIN, P.; KASIM-KARAKAS, S.; WATERHOUSE, A. L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 1747-1750, 2001.

CUNHA, W. R. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão Filho (Vernoniae, Compositae)**. 1994. 166 f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1994.

CYRILLO, M.; GALVÃO, D. S. Chem2Pac: a computational chemistry integrator for windows. **European Photochemistry Association Newsletter**, Clermont Ferrand, v. 67, p. 31-34, 1999.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 36, p. 109-126, 2001.

DAVATELIS, G.; WOLPE, S. D.; SHERRY, B.; DAYER, J. M.; CHICHEPORTICHE, R.; CERAMI, A. Macrophage inflammatory protein-1: a prostaglandin-independent endogenous pyrogen. **Science**, Washington, v. 243, p. 1066-1068, 1989.

DERAEDT, R.; JOURQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an allogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 61, p. 17-24, 1980.

DEWAR, M. J. S.; ZOEBSCH, E. G.; HEALY, E. F.; STEWART, J. J. P. Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 80, p. S77-S112, 1998.

DIXON, S. L.; VILLAR, H. O. Bioactive diversity and screening library selection via affinity fingerprinting. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, Washington, v. 38, p. 1192-1203, 1998.

DODD, R. C.; COHEN, M. S.; NEWMAN, S. L.; GRAY, T. K. Vitamin D metabolites change the phenotype of monoblastic U-937 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences**, Washington, v. 80, p. 7538-7541, 1983.

DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G.; XIE, L. Y. Polyhaloporphyrins: unusual ligands for metals and metal-catalyzed oxidations. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 30, p. 251-259, 1997.

DRAY, A. *Inflammatory mediators of pain*. **British Journal of Anaesthesia**, Oxford, v. 75, p. 125-131, 1995.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, London, v. 287, p. 1960-1964, 2000.

DREWS, J. Innovation deficit revisited: reflections on the productivity of pharmaceutical R&D. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 3, p. 491-494, 1998.

DREWS, J. Strategic trends in the drug industry. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 8, p. 411-420, 2003.

DREWS, J.; RYSER, S. The role of innovation in drug development. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 1318-1319, 1997.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. *The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats*. **Pain**, Amsterdam, v. 4, p. 161-174, 1977.

EDWARDS, E.; THOMAS-OATES, J. Hyphenating liquid phase separation techniques with mass spectrometry: on-line or off-line. **Analyst**, Cambridge, v. 130, p. 13-17, 2005.

EGAN, C. G.; LOCKHART, J. C.; FERRELL, W. R.; DAY, S. M.; MCLEAN, J. S. Pathophysiological basis of acute inflammatory hyperaemia in the rat knee: roles of cyclo-oxygenase-1 and-2. **Journal of Physiology-London**, New York, v. 539, p. 579-587, 2002.

EL-SEEDI, H. R.; RINGBOM, T.; TORSELL, K.; BOHLIN, L.; Constituents of *Hypericum laricifolium* and their cyclooxygenase (COX) enzyme activities. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 51, p. 1439-1440, 2003.

ESTABROOK, R. W. A passion for P450s (remembrances of the early history of research on cytochrome P450). **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 31, p. 1461-1473, 2003.

EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; VAN BEEK, T. A.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P.; ALBERT, K. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, West Sussex, v. 43, p. 681-687, 2005.

FERNANDEZ-METZLER, C. L.; OWENS, K. G.; BAILLIE, T. A.; KING, R. C. Rapid liquid chromatography with tandem mass spectrometry-based screening procedures for studies on the biotransformation of drug candidates. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 27, p. 32-40, 1999.

FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; HYSLOOP, S. Role of the inducible forms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammatory pain. In: WILLOUGHBY, D. A.; TOMLINSON, A. (Eds.). **Inducible enzymes in the inflammatory response**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1999. p. 149-167.

*FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M.; CASTRO, A. M. S. The hyperalgesic effects of prostaglandin E<sub>2</sub> and prostacyclin. Prostaglandins*, New York, v. 16, p. 31-37, 1978.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; TOMMASINI, S.; CALABRO, M. L.; RAGUSA, S.; BARBERA, R.; RAPISARDA, A. Leaf extracts of some *Cordia* species: analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco**, Rome, v. 50, p. 245-256, 1995.

FITZPATRICK, A. Ethics and animal research. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 141, p. 89-90, 2003.

FLAUSINO, D.; SAKAMOTO, H. T.; PEREIRA, A. M. S.; LOPES, N. P. Constituintes químicos da superfície foliar de *Lychnophora ericoides*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2000. res. 111.

FLEMING, A. On the bacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, London, v. 10, p. 226-236, 1929.

FLOWER, R. J.; VANE, J. R. Inhibition of PG synthetase in brain explains the anti-pyretic activity of paracetamol (4-acetamidophenol). **Nature**, London, v. 240, p. 410-411, 1972.

FONTECAVE, M.; MANSUY, D. Monooxygenase-like oxidations of olefins and alkanes catalyzed by manganese porphyrins: comparison of systems involving either O<sub>2</sub> and ascorbate or iodosylbenzene. **Tetrahedron**, Oxford, v. 40, p. 4297-4311, 1984.

FORSTERMANN, U.; NEUFANG, B. The endothelium-dependent vasodilator effect of acetylcholine: characterization of the endothelial relaxing factor with inhibitors of arachidonic acid metabolism. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 103, p. 65-70, 1984.

GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R.; FEARON, D. T.; HAYNES, B. F.; NATHAN, C. N. **Overview in Inflammation**: basic principles and clinical correlates. 3. ed. Hagerstown: Lippincott, Williams and Wilkins, 1999. 1360 p.

GELPI, E. Biomedical and biochemical applications of liquid-chromatography mass-spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 703, p. 59-80, 1995.

GIOVANNINI, L.; MIGLIORI, M.; FILIPPI, C.; ORIGLIA, N.; PANICHI, V.; FALCHI, M.; BERTELLI, A. A.; BERTELLI, A. Inhibitory activity of the white wine compounds, tyrosol and caffeic acid, on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  release in human peripheral blood mononuclear cells. **International Journal of Tissue Reactions – Experimental and Clinical Aspects**, Carouge, v. 24, p. 53-56, 2002.

GLASOW, A.; PRODROMOU, N.; XU, K.; VON LINDERN, M.; ZELEN, A. Retinoids and myelomonocytic growth factors cooperatively activate RARA and induce human myeloid leukemia cell differentiation via MAP kinase pathways. **Blood**, Washington, v. 105, p. 341-349, 2005.

GOBBO-NETO, L. **Estudo fitoquímico do extrato polar das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. e avaliação de sua atividade antiinflamatória**. 2002. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activity of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* Mart. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 71, p. 3-6, 2005.

GONGORA, L.; GINER, R. M.; MANEZ, S.; RECIO, M. D.; SCHINELLA, G.; RIOS, J. L. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. **Life Sciences**, Oxford, v. 71, p. 2995-3004, 2002.

GRAEL, C. F. F. **Estudo químico e ensaios biológicos de *Lychnophora pohlii* Schultz-Bip. (Vernonieae, Asteraceae)**. 2003. 187 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

GRANT, W. G. Drug therapy: drug metabolism and variability among patients in drug response. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 352, p. 2211-2221, 2005.

GREGORY, R. K.; SMITH, I. E. Vinorelbine - a clinical review. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 82, p. 1907-1913, 2000.

GROVES, J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrin-catalyzed oxidations. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, West Sussex, v. 4, p. 350-352, 2000.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E. Epoxidation reactions catalyzed by iron porphyrins - oxygen-transfer from iodosylbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 105, p. 6243-6248, 1983.

GROVES, J. T.; NEMO, T. E.; MYERS, R. S. Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron-porphyrin complexes, oxygen transfer from iodosilbenzene. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 101, p. 1032-1033, 1979.

GUENGERICH, F. P. Life and times in biochemical toxicology. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 24, p. 5-21, 2005.

HABTEMARIAM, S. Natural inhibitors of tumour necrosis factor- $\alpha$  production, secretion and function. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, p. 303-313, 2000.

HALLIWELL, B.; RAFTER, J.; JENNER, A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 268S-276S, 2005.

HARRIS, P. E.; RALPH, P.; LITCOFSKY, P.; MOORE, M. A. S. Distinct activities of interferon- $\gamma$ , lymphokine and cytokine differentiation-inducing factors acting on the human monoblastic leukaemia cell line. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 45, p. 9-13, 1985.



HARRIS, P.; RALPH, P. Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. **Journal of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 37, p. 407-422, 1985.

HARRIS, S. G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 23, p. 144-150, 2002.

HASHIMOTO, S.; MOROHOSHI, K.; SUZUKI, T.; MATSUSHIMA, K. Lipopolysaccharide-inducible gene expression profile in human monocytes. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Oslo, v. 35, p. 619-627, 2003.

HEISKE, A.; JESBERG, J.; KRIEG, J. C.; VEDDER, H. Differential effects of antidepressants on glucocorticoid receptors in human primary blood cells and human monocytic U-937 cells. **Neuropsychopharmacology**, London, v. 28, p. 807-817, 2003.

*HENKER, R.; KRAMER, D.; ROGERS S. Fever. AACN Clinical Issues, Baltimore, v. 8, p. 351-367, 1997.*

HIGUCHI, T.; HIROBE, M. Four recent studies in cytochrome P450 modelings: a stable iron porphyrin coordinated by a thiolate ligand; a robust ruthenium porphyrin-pyridine N-oxide derivatives system; polypeptide-bound iron porphyrin; application to drug metabolism studies. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 113, p. 403-422, 1996.

HINO, F.; DOLPHIN, D. The biomimetic oxidation of dieldrin using polyhalogenated metalloporphyrins. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 7, p. 629-630, 1999.

HIRSCHFELD, T. Hy-phen-ated methods. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 52, p. A297, 1980.

HOSOYA, H.; MARUNOUCHI, T. Differentiation and dedifferentiation of the human monocytic leukaemia cell line. **Cell Structure and Function**, Kyoto, v. 17, p. 263-269, 1992.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**, São Carlos: EdUFSCAR, 2003, p. 7-42.

*HUANG, M. T.; LYSZ, T.; FERRARO, T.; ABIDI, T. F.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. Cancer Research, Philadelphia, v. 51, p. 813-819, 1991.*

HUIZING, M. T.; MISSER, V. H. S.; PIETERS, R. C.; HUININK, W. W. T.; VEENHOF, C. H. N.; VERMORKEN, J. B.; PINEDO, H. M.; BEIJNEN, J. H. **Cancer Investigation**, New York, v. 13, p. 381-404, 1995.

HUXTABLE, R. J.; SCHWARZ, S. K. The isolation of morphine--first principles in science and ethics. **Molecular Interventions**, Bethesda, v. 1, p. 189-191, 2001.

IAMAMOTO, Y.; ASSIS, M. D.; CIUFFI, K. J.; SACCO, H. C.; IWAMOTO, L. S.; MELO, A. J. B.; NASCIMENTO, O. R.; PRADO, C. M. C. Factors which affect the catalytic activity of iron(III) meso tetrakis(2,6-dichlorophenyl)porphyrin chloride in homogeneous system. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 109, p. 189-200, 1996.

IAMAMOTO, Y.; CIUFFI, K. J.; IWAMOTO, L. S.; SACCO, H. C.; MELO, A. J. B.; PRADO, C. M. C.; ASSIS, M. D. Factors affecting the catalytic activity of aryl substituted ironporphyrins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 6, p. 251-256, 1995.

ILIEVA, I.; OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, K.; KASE, S.; KITAMEI, H.; TAKEMOTO, Y.; YAZAWA, K.; OHNO, S. The effects of Ginkgo biloba extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Experimental Eye Research**, London, v. 79, p. 181-187, 2004.

JACKSON, A. J.; ROBBIE, G.; MARROUM, P. Metabolites and bioequivalence - past and present. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v. 43, p. 655-672, 2004.

JELKMANN, W. Molecular biology of erythropoietin. **Internal Medicine**, Tokyo, v. 43, p. 649-659, 2004.

JIN, X.; OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; SUZUKI, Y.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, K.; ILIEVA, I.; TANAKA, T.; ONOE, K.; OHNO, S. Effects of blue honeysuckle (*Lonicera caerulea* L.) extract on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo. **Experimental Eye Research**, v. 82, p. 860-867, 2006.

JORDÃO, C. O. **Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora gardneri* Schultz-Bip.** 2003. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

JOSEPHY, P.; GUENGERICH, F. P.; MINERS, J. O. Phase I and phase II drug metabolism: Terminology that we should phase out? **Drug Metabolism Reviews**, Philadelphia, v. 37, p. 575-580, 2005.

KARIMA, R.; MATSUMOTO, S.; HIGASHI, H.; MATSUSHIMA, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Molecular Medicine Today**, Oxford, v. 5, p. 123-132, 1999.

KASPER, S. Hypericum perforatum - a review of clinical studies. **Pharmacopsychiatry**, Stuttgart, v. 34, suppl. 1, p. S51-S55, 2001.

KATO, K.; JINGU, S.; OGAWA, N.; HIGUCHI, S. Differentiation between isomeric oxidative metabolism of piperidine-containing drug by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with stable-isotope tracer technique. **Biomedical Chromatography**, West Sussex, v. 16, p. 25-30, 2002.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S.; HATEM, A. M.; DE VRIES, P. J.; EL-SHAFEI, S.; KHATTAB, M. M. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Oxford, v. 17, p. 93-102, 2003.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, Kyoto, v. 96, p. 229-245, 2004.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; AGATA, I.; ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds, V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 50, p. 473-477, 1984.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; AGATA, I.; ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VI. Inhibitory effects of caffeoylquinic acids on histamine release from rat peritoneal mast cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 33, p. 690-696, 1985.

KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds, X. Effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 50, p. 392-399, 1987.

KINGHORN, A. D. Pharmacognosy in the 21<sup>st</sup> century. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology**, Washington, v. 53, p. 135-148, 2001.

KISHIMOTO, T. Interleukin-6: from basic science to medicine - 40 years in immunology. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 23, p. 1-21, 2005.

KITAMURA, H.; NAKAGAWA, T.; TAKAYAMA, M.; KIMURA, Y.; HIJIKI, A.; OHARA, O. Post-transcriptional effects of phorbol 12-myristate 13-acetate on transcriptome of U937 cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 578, p. 180-184, 2004.

- KLUGER, M. J. Fever – role of pyrogens and cryogens. **Physiological Review**, Bethesda, v. 71, p. 93-127, 1991.
- KO, K.; KOPROWSKI, H. Plant biopharming of monoclonal antibodies. **Virus Research**, Amsterdam, v. 111, p. 93-100, 2005.
- KOSHIHARA, Y.; NEICHI, T.; MUROTA, S.; LAO, A.; FUJIMOTO, Y.; TATSUNO, T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 792, p. 92-97, 1984.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 18, p. 412, 1959.
- KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, New York, v. 24, p. 113-119, 2002.
- LAMBERT, J. D.; HONG, J. H.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 284S-291S, 2005.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Enzymes. *In: Principles of biochemistry*. W.H. Freeman, New York, NY, USA, 2000.
- LI, B. Q.; FU, T.; GONG, W. H.; DUNLOP, N.; KUNG, H.; YAN, Y.; KANG, J.; WANG, J. M. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 49, p. 295-306, 2000.
- LI, Y. L., BUT, P. P. H.; OOI, V. E. C. Antiviral activity and mode of action of caffeoylquinic acids from *Schefflera heptaphylla* (L.) Frodin. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 68, p. 1-9, 2005.
- LIM, C.; LORD, G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 24, p. 547-557, 2002.
- LOPES, N. P. A essência da arnica. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, n. 64, p. 42-44, 2001.
- LOPES, N. P.; STARK, C. B. W; HONG, H.; GATES, P. J.; STAUTON, J. A study of the effect of pH, solvent system, cone potential and the addition of crown ethers on the formation of the monensin protonated parent ion in electrospray mass spectrometry. **Analyst**, Cambridge, v. 126, p. 1630-1632, 2001.
- MAHADY, G. B. Global harmonization of herbal health claims. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, p. 1120-1123, 2001.
- MANACH, C.; WILLIANSOM, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 81, p. 230S-242S, 2005.
- MASIHI, K. N. Fighting infection using immunomodulatory agents. **Expert Opinion on Biological Therapy**, London, v. 1, p. 641-653, 2001.
- MAURER, M.; THEOHARIDES, T.; GRANSTEIN, R. D.; BISCHOFF, S. C.; BIENENSTOCK, J.; HENZ, B.; KOVANEN, P.; PILIPONSKY, A. M.; KAMBE, N.; VLIAGOFTIS, H.; LEVI-SCHAFFER, F.; METZ, M.; MIYACHI, Y.; BEFUS, D.; FORSYTHE, P.; KITAMURA, Y.; GALLI, S. What is the physiological function of mast cells? **Experimental Dermatology**, Oxford, v. 12, p. 886-910, 2003.
- McCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, Oxford, v. 78, p. 476-484, 2005.

McMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. (Eds.). **Wall and melzack's textbook of pain**. 5. ed. London: Churchill Livingstone, 2005. 1268 p.

MELO, A. J. B.; IAMAMOTO, Y.; MAESTRIN, A. P. J.; LINDSAY-SMITH, J. R.; SANTOS, M. D.; LOPES, N. P.; BONATO, P. S. Biomimetic oxidation of praziquantel catalysed by metalloporphyrins. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 226, p. 23-31, 2005.

MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Sciences**, Oxford, v. 75, p. 1021-1027, 2004.

MERFORT, I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 31, p. 2111-2113, 1992.

MEUNIER, B. Metalloporphyrins as versatile catalysts for oxidation reactions and oxidative DNA cleavage. **Chemical Reviews**, Washington, v. 92, p. 1411-1456, 1992.

MEUNIER, B.; BERNADOU, J. Metal-oxo species in P450 enzymes and biomimetic models. Oxo-hydroxo tautomerism with water-soluble metalloporphyrins. **Topics in Catalysis**, New York, v. 21, p. 47-54, 2002.

MEYER, M. C.; RASTOGI, P.; BECKETT, C. S.; MCHOWAT, J. Phospholipase A2 inhibitors as potential anti-inflammatory agents. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 11, p. 1301-1312, 2005.

MICELI, N.; TAVIANO, M. F.; GIUFFRIDA, D.; TROVATO, A.; TZAKOU, O.; GALATI, E. M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Bentham. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 97, p. 261-266, 2005.

MICHALUART, P.; MASFERRER, J. L.; CAROTHERS, A. M.; SUBBARAMAIAH, K.; ZWEIFEL, B. S.; KOBOLDT, C.; MESTRE, J. R.; GRUNBERGER, D.; SACKS, P. G.; TANABE, T.; DANNENBERG, A. J. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **Cancer Research**, Birmingham, v. 59, p. 2347-2352, 1999.

MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; KEARNS, E. H.; TIMMERMANN, B. N. Mass spectrometry of 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. **Journal of Mass Spectrometry**, West Sussex, v. 34, p. 1240-1252, 1999.

MIÑANO, F. J.; SANCIBRIAN, M.; VIZCAINO, M.; PAEZ, X.; DAVATELIS, G.; FAHEY, T.; SHERRY, B.; CERAMI, A.; MYERS, R. D. Macrophage inflammatory protein-1: unique action on the hypothalamus to evoke fever. **Brain Research Bulletin**, Oxford, v. 24, p. 849-852, 1990.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 55, p. 441-449, 1996.

MONTANARI, F.; CASELLA, L. (Eds.). **Metalloporphyrins catalyzed oxidations**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1994. 351 p.

MOPAC: a general molecular orbital package. Programa desenvolvido por J. J. STEWART, 1988. In: **Quantum Chemistry Program Exchange 445**. Disponível em: <<http://qcpe.chem.indiana.edu/>>. Acesso em: 15 mar. 2005.

MORIDANI, M. Y.; SCOBIE, H. JAMSHIDZADEH, A.; SALEHI, P.; O'BRIEN, J. Caffeic acid, chlorogenic acid, and dihydrocaffeic acid metabolism: glutathione conjugate formation. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 29, p. 1432-1439, 2001.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, Totowa, v. 225, p. 115-121, 2003.

MORROW, J. D.; HILL, K. E.; BURK, R. F.; NAMMOUR, T. M.; BADR, K. F.; ROBERTS II, L. J. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, Washington, v. 87, p. 9383-9387, 1990.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E<sub>2</sub>-biosynthetic pathway. *Progress in Lipid Research*, Oxford, v. 43, p. 3-35, 2004.

NAKAMURA, N.; HAYASAKA, S.; ZHANG, X. Y.; NAGAKI, Y.; MATSUMOTO, M.; HAYASAKA, Y.; TERASAWA, K. Effects of baicalin, baicalein, and wogonin on interleukin-6 and interleukin-8 expression, and nuclear factor-kappa b binding activities induced by interleukin-1 beta in human retinal pigment epithelial cell line. *Experimental Eye Research*, London, v. 77, p. 195-202, 2003.

NIESSEN, W. M. A.; TINKE, A. P. Liquid-chromatography mass-spectrometry - general-principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 703, p. 37-57, 1995.

NOGATA, Y.; SEKIYA, K.; OHTA, H.; KUSUMOTO, K.; ISHIZU, T. Inhibitors of platelet lipoxygenase from Ponkan fruit. *Phytochemistry*, Oxford, v. 56, p. 729-732, 2001.

NYSKA, A.; KOHEN, R. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, Philadelphia, v. 30, p. 620-650, 2002.

OBERLIES, N. H.; KROLL, D. J. Camptothecin and taxol: historic achievements in natural products research. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 67, p. 129-135, 2004.

OBERTREIS, B.; GILLER, K.; TEUCHER, T.; BEHNKE, B.; SCHMITZ, H. Anti-inflammatory effect of *Urtica dioica* folia extract in comparison to caffeic malic acid. *Arzneimittelforschung/Drug Research*, Aulendorf, v. 46, p. 52-56, 1996.

OH, G. S.; PAE, H. O.; CHOI, B. M.; JEONG, S.; OH, H.; OH, C. S.; RHO, Y. D.; KIM, D. H.; SHIN, M. K.; CHUNG, H. T. Inhibitory effects of the root cortex of *Paeonia suffruticosa* on interleukin-8 and macrophage chemoattractant protein-1 secretions in U937 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, Amsterdam, v. 84, p. 85-89, 2003.

OLIVEIRA, E. J.; WATSON, D. G. Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of the metabolism of drugs and other xenobiotics. *Biomedical Chromatography*, West Sussex, v. 14, p. 351-372, 2000.

OLSSON, I. L.; BREITMAN, T. R. Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U937 by retinoic acid and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-inducing agents. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 42, p. 3924-3927, 1982.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v. 131, p. 66-71, 2001.

OMENN, G. S.; GOODMAN, G. E.; THORNQUIST, M. D.; BALMES, J.; CULLEN, M. R.; GLASS, A.; KEOGH, J. P.; MEYSKENS, F. L. JR.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J. H.; BARNHART, S.; HAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin on lung cancer and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 334, p. 1150-1155, 1996.

OWUOR, E. D.; KONG, A. T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 64, p. 765-770, 2002.

- PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; O'NEILL, L. A. J. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, toll-like receptor-4. **Immunology**, Oxford, v. 113, p. 153-162, 2004.
- PARK, Y.; KIM, I.; PARK, H.; CHOI, J.; PARK, K.; LEE, J.; NAM, B.; KIM, D.; LEE, J.; LEE, K. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of the methanol extract of *Fomes fomentarius*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, p. 1588-1593, 2004.
- PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 10, p. 495-502, 2005.
- PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analysis**, West Sussex, v. 9, p. 177-185, 1998.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy**, Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996, 515 p.
- PAYNE, T. G.; DEWALD, B.; SIEGL, H.; GUBLER, H. U.; OTT, H.; BAGGIOLINI, M. Radical scavenging and stimulation of prostaglandin synthesis not anti-inflammatory. **Nature**, London, v. 296, p. 160-162, 1982.
- PEDERSEN, P. L.; GREENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver and liver-derived tissues. **Methods in Cell Biology**, San Diego, v. 20, p. 411-481, 1978.
- PELUSO, G.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E.; VUOTTO, M. L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide ion production. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 58, p. 639-646, 1995.
- PICMAN, A. K. Biological-activities of sesquiterpene lactones. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 14, p. 255-281, 1986.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.
- PLUMMER, S. M.; HOLLOWAY, K. A.; MANSON, M. M.; MUNKS, R. J.; KAPTEIN, A.; FARROW, S.; HOWELLS, L. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex. **Oncogene**, London, v. 18, p. 6013-6020, 1999.
- PORTER, T. D. Jud Coon: 35 years of P450 research, a synopsis of P450 history. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 32, p. 1-6, 2004.
- PRATICÒ, D.; ROKACH, J.; LAWSON, J.; FITZGERALD, G. A. F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. **Chemistry and Physics of Lipids**, Clare, v. 128, p. 165-171, 2004.
- PUSHKAREVA, M. Y.; WANNBERG, S. L.; JANOFF, A. S.; MAYHEW, E. Increased cell-surface receptor expression on U-937 cells induced by 1-O-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphocholine. **Cancer Immunology Immunotherapy**, New York, v. 48, p. 569-578, 2000.
- QURESHI, S.; LARIVIERE, L.; LEVEQUE, G.; MOORE, K.; GROS, P.; MALO, D. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 189, p. 615-625, 1999.

RALPH, P.; WILLIAMS, N.; MOORE, M. A. S.; LITCOFSKY, P. Induction of antibody-dependent and nonspecific tumor killing in human monocyte leukemic cells by non-lymphocyte factors and phorbol ester. **Cellular Immunology**, San Diego, v. 71, p. 215-232, 1982.

RASTRELLI, L.; SARAVIA, A.; HERNANDEZ, M.; DE SIMONE, F. Antiinflammatory activity-guided fractionation of *Gnaphalium stramineum*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 36, p. 315-319, 1998.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIETHMILLER, S. From atoxyl to alvarsan: searching for the magic bullet. **Chemotherapy**, Basel, v. 51, p. 234-242, 2005.

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; DE HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; VAN ZANDEN, J. J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 11, p. 321-333, 2002.

ROBINSON, H. Generic and subtribal classification of American Vernoniae. **Smithsonian contributions to botany**. Washington: Smithsonian Institution, n. 89, 1999. 116p.

ROMANOVSKY, A. A.; ALMEIDA, M. C.; ARANOFF, D. M.; IVANOV, A. I.; KONSMAN J. P.; STEINER, A. A.; TUREK, V. F. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in Bioscience**, Manhasset, v. 10, p. 2193-2216, 2005.

ROSSI, A.; LIGRESTI, A.; LONGO, R.; RUSSO, A.; BORRELLI, F.; SAUTEBIN, L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. **Phytomedicine**, Jena, v. 9, p. 530-535, 2002.

RÜNGLER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- $\kappa$ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 7, p. 2343-2352, 1999.

SACCO, H. C.; IAMAMOTO, Y.; LINDSAY-SMITH, J. R. Alkene epoxidation with iodosylbenzene catalysed by polyionic manganese porphyrins electrostatically bound to counter-charged supports. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions 2**, Cambridge, v. 2, p. 181-190, 2001.

SACHA, T.; ZAWADA, M.; HARTWICH, J.; LACH, Z.; POLUS, A.; SZOSTEK, M.; ZDZIŁOWSKA, E.; LIBURA, M.; BODZIOCH, M.; DEMBINSKA-KIEC, A.; SKOTNICKI, A. B.; GORALCZYK, R.; WERTZ, K.; RISS, G.; MOELE, C.; LANGMANN, T.; SCHMITZ, G. The effect of beta-carotene and its derivatives on cytotoxicity, differentiation, proliferative potential and apoptosis on the three human acute leukemia cell lines: U-937, HL-60 and TF-1. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis Of Disease**, Amsterdam, v. 1740, p. 206-214, 2005.

SALTZMANN, H.; SHAREFKIN, J. G.; Iodosobenzene. **Organic Synthesis**, New York, v. 5, p. 658, 1973.

SANTOS, A. R.; VEDANA, E. M.; DE FREITAS, G. A. Antinociceptive effect of meloxicam in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, Basel, v. 47, p. 302-307, 1998.

SANTOS, M. D. **Isolamento dos constituintes polares e avaliação da atividade antinociceptiva das raízes de *Lychnophora ericoides* Mart.** 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from *Lychnophora ericoides* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 96, p. 545-549, 2005a.

SANTOS, M. D.; MARTINS, P. R.; SANTOS, P. A.; BORTOCAN, R.; IAMAMOTO, Y.; LOPES, N. P. Oxidative metabolism of 5-o-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), a bioactive natural product, by metalloporphyrin and rat liver mitochondria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 26, p. 62-70, 2005b.

SANTOS, P. A. **Análise química de calos de *Lychnophora ericoides***. 2000. 87 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

SATINDER, A. **Chromatography and separation science**. Boston: Academic Press, 2003. 250p.

SAUER, U. G. Avoidance of animal experiments in the new EU chemicals regulation - opportunities and problems from the point of view of animal welfare. **Altex-Alternativen zu Tierexperimenten**, Heidelberg, v. 21, p. 9-14, 2004.

SAWYNOK, S. J. *Topical and peripherally acting analgesics*. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 55, p. 1-20, 2003.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, 2001, 3.ed., cap. 15.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 3, p. 577-608, 1999.

SEDGWICK, A. D.; WILLOUGHBY, D. A. Animal models for testing immunopharmacological agents. In: DALE, M. M; FOREMAN, J. C.; FAN, T. D. (Eds.). **Textbook of immunopharmacology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. p.279.

SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora Mart. (Vernoniae: Compositae)***. 1991. 515 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

SHIN, K. M.; KIM, I. T.; PARK, Y. M.; HA, J.; CHOI, J. W.; PARK, H. J.; LEE, Y. S.; LEE, K. T. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 68, p. 2327-2336, 2004.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 135, p. 969-972, 2005.

SMITH, R. D.; LOO, J. A.; LOO, R. O.; BUSMAN, M.; UDSETH, H. R. Principles and practice of electrospray ionization - mass spectrometry for large polypeptides and proteins. **Mass Spectrometry Reviews**, West Sussex, v. 10, p. 359-452, 1991.

SMITH, W. L.; MARNETT, L. J.; DEWITT, D. L. Prostaglandin and thromboxane biosynthesis. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 49, p. 153-179, 1991.

SMOLINKA, K.; GOBER, B. Biomimetic oxidation of denaverine hydrochloride. **European Journal of Organic Chemistry**, Berlin, v. 3, p. 679-683, 1999.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Organic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons. 7. ed. 2000. 1258 p.

STICHER, O. Quality of Ginkgo preparations. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, p. 2-11, 1993.



TANAKA, S.; TAJIMA, M.; TSUKADA, M.; TABATA, M. A comparative study on anti-inflammatory activities of the enantiomers, shikonin and alkannin. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 49, p. 66-69, 1986.

TAYLOR, B. K.; BASBAUM, A. I. Early antinociception delays edema but does not reduce the magnitude of persistent pain in formalin test. **The Journal of Pain**, Washington, v. 1, p. 218-228, 2000.

THOMSON, A. W.; LOTZE, M.T. (Eds.). **The Cytokine Handbook**. 4. ed. New York: Academic Press, 2003. 1572 p.

THUMMEL, K. E.; KUNZE, K. L.; SHEN, D. D. Enzyme-catalyzed processes of first-pass hepatic and intestinal drug extraction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 27, p. 99-127, 1997.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Amsterdam, v. 51, p. 5-17, 1992.

TODAKA, T.; ISHIDA, T.; KITA, H.; NARIMATSU, S.; YAMANO, S. Bioactivation of morphine in human liver: Isolation and identification of morphinone, a toxic metabolite. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, p. 1275-1280, 2005.

TORDJMAN, C.; COGE, F.; ANDRE, N.; RIQUE, H.; SPEDDING, M.; BONNET. Characterisation of cyclooxygenase 1 and 2 expression in mouse resident peritoneal macrophages in vitro; interactions of non steroidal anti-inflammatory drugs with COX2. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1256, p. 249-256, 1995.

TOWNSEND, D. M.; DENG, M.; ZHANG, L.; LAPUS, M. G.; HANIGAN, M. H. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. **Journal of The American Society of Nephrology**, Philadelphia, v. 14, p. 1-10, 2003.

TOY, P. H.; NEWCOMB, M.; HOLLENBERG, P. F. Hypersensitive mechanistic probe studies of cytochrome P450-catalyzed hydroxylation reactions. Implications for the cationic pathway. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 120, p. 7719-7729, 1998.

TRAYLOR, P. S.; DOLPHIN, D.; TRAYLOR, T. G. Sterically protected hemins with electronegative substituents: efficient catalysts for hydroxylation and epoxidation. **Journal of Chemistry Society - Chemical Communications**, Cambridge, v. 5, p. 279-280, 1984.

TRAYLOR, T. G. Kinetics and mechanism studies in biomimetic chemistry - metalloenzyme model systems. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 63, p. 265-274, 1991.

UENO, A.; MATSUMOTO, H.; NARABA, H.; IKEDA, Y.; USHIKUBI, F.; MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; ICHIKAWA, A.; OH-ISHI, S. Major roles of prostanooids receptors EP and IP<sub>3</sub> in endotoxin-induced enhancement of pain perception. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 62, p. 157-160, 2001.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature-New Biology**, Hampshire, v. 231, p. 232-235, 1971.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflammation Research**, Basel, v. 47, p. S78-S87, 1998.

VANE, S. J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. **Thorax**, London, v. 55, sup. 1, p. S3-S9, 2000.

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.

VIDAL, M.; BONNAFOUS, M.; DEFRANCE, S.; LOISEAU, P.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. Model systems for oxidative drug-metabolism studies - catalytic behavior of water-soluble metalloporphyrins depends on both the intrinsic robustness of the catalyst and the nature of substrates. **Drug Metabolism and Disposition**, Bethesda, v. 21, p. 811-817, 1993.

VINHADO, F. S.; PRADO-MANSO, C. M. C.; SACCO, H. C.; IAMAMOTO, Y. Cationic manganese(III) porphyrins bound to a novel bis-functionalised silica as catalysts for hydrocarbons oxygenation by iodobenzene and hydrogen peroxide. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 174, p. 279-288, 2001.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J. P.; WENNBERG, T.; VUORELA, H. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 11, p. 1375-1389, 2004.

VYAS, H.; KRISHNASWAMY, G. Paul Ehrlich's "Mastzellen" - from aniline dyes to DNA chip arrays: a historical review of developments in mast cell research. In: KRISHNASWAMY, G.; CHI, D. S. **Mast Cells (Methods in Molecular Biology)**, New York: Humana Press, 2006, v. 315, p. 3-11.

WADSWORTH, T. L.; KOOP, D. R. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 57, p. 941-949, 1999.

WAINWRIGHT, M. The use of dyes in modern biomedicine. **Biotechnic & Histochemistry**, Groningen, v. 78, p. 147-155, 2003.

WANG J, MAZZA G. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 850-857, 2002.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. **Biotechniques**, Westborough, v. 39, p. 75-85, 2005.

WONG, P. K. K.; CAMPBELL, I. K.; EGAN, P. J.; ERNST, M.; WICKS, I. P. The role of the interleukin-6 family of cytokines in inflammatory arthritis and bone turnover. **Arthritis and Rheumatism**, New York, v. 48, p. 1177-1189, 2003.

YANG, R. B.; MARK, M. R.; GRAY, A.; HUANG, A.; XIE, M. H.; ZHANG, M.; GODDARD, A.; WOOD, W. I.; GURNEY, A. L.; GODOWSKI, P. J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, London, v. 395, p. 284-288, 1998.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E.; SILVA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **American Journal Physiology**, Bethesda, v. 266, p. R1670-R1674, 1994.

ZHOU, W.; CHAI, H.; LIN, P. H.; LUMSDEN, A. B.; YAO, Q.; CHEN, C. Clinical use and molecular mechanisms of action of extract of Ginkgo biloba leaves in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Drug Reviews**, Branford, v. 22, p. 309-319, 2004.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigation of experimental pain conscious animals. **Pain**, Amsterdam, v. 16, p. 109-110, 1983.

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZENBACHER, P. Cytochromes P-450 and experimental models of drug metabolism. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 6, p. 189-198, 2002.