



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**NÚCLEO DE PESQUISA EM PLANTAS MEDICINAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**



**FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA**

**FERULATO DE ETILA APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA VIA  
MECANISMOS ANTIOXIDANTES, INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
E DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$**

**TERESINA**

**2015**

**FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA**

**FERULATO DE ETILA APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA VIA  
MECANISMOS ANTIOXIDANTES, INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
E DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais NPPM/CCS da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira

**TERESINA**

**2015**

**FERULATO DE ETILA APRESENTA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA VIA  
MECANISMOS ANTIOXIDANTES, INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS  
E DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS TNF- $\alpha$  E IL-1 $\beta$**

**FRANCISCO VALMOR MACEDO CUNHA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais NPPM/CCS da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira  
(Orientador)  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)**

---

**Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior  
(Examinador Externo)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Regina de Castro Almeida  
(Examinador Interno)  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**REITOR**

Prof. Dr. José Arimatéia Dantas Lopes

**VICE-REITORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Nadir d Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Prof. Dr. Saulo Cunha de Serpa Brandão

**DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Ferraz Mendes

**VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lina Gomes Santos

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
FARMACOLOGIA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Meneses Oliveira

*“O barro ao barro, o pó ao pó, a terra à terra, nada começa que não tenha de acabar, tudo o que começa nasce do que acabou.”*

José Saramago

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela providência de todas as condições necessárias, pessoas e circunstâncias favoráveis a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Rosa e Valdeci, pelo muito apoio e exemplos de dedicação e responsabilidade.

À minha esposa, Angélica Coelho, pela paciência e amor nos momentos de ausência durante esta trajetória.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Oliveira, meu orientador, pela parceria, confiança, paciência e dedicação ao longo desses anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo de Carvalho e Martins, por me introduzir na vida acadêmica, acreditar e pelas colaborações no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Macedo, coordenador do setor de radiologia do Hospital Universitário Veterinário-UFPI, por gentilmente ter cedido o espaço para realização das radiografias dos animais.

Ao Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa pelo suprimento da substância-teste sempre que solicitada.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho por gentilmente ter cedido seu laboratório para o desenvolvimento da pesquisa.

À Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda Regina de Castro Almeida pelos ensinamentos ao longo da disciplina de Estágio em Docência e pelas importantes considerações na qualificação deste trabalho.

À todos os professores que compõem o Mestrado de Farmacologia pelas colaborações prestadas, ensinamentos socializados e conselhos confidenciais.

Aos colegas de laboratório Bruno Gomes, Benedito Neto, Éverton Lopes e Rodolfo pelo apoio e ajuda durante o desenvolvimento dos experimentos.

Às amigas de NPPM, Wilmara Carvalho e Elza Maiara pelas conversas, risos e compartilhamento de vitórias e frustrações.

Aos amigos Josy, Carlos e Patrícia pelas funções desempenhadas no Núcleo, importantes para seu funcionamento.

À Universidade Federal do Piauí pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

CUNHA, F. V. M. Ferulato de etila apresenta atividade anti-inflamatória via mecanismos antioxidantes, inibição da migração de neutrófilos e da liberação de citocinas pró-inflamatórias  $\text{tnf-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ . Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, NPPM/CCS/UFPI, 2015.

## RESUMO

A inflamação é uma resposta adaptativa fisiológica desencadeada por estímulos ou condições como infecção e lesão tecidual. A resolução depende de um complexo processo que envolve a modulação de agentes humorais incluindo as prostaglandinas, interleucinas e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; e celulares como neutrófilos, leucócitos e mastócitos. Os fármacos utilizados para o tratamento de inflamação incluem os anti-inflamatórios não-esteroidais que podem ser nocivos ao trato gastrointestinal e os corticosteróides os quais possuem variados efeitos secundários, especialmente quando utilizados cronicamente. Nesse sentido, óleos essenciais, ricos em fenilpropanóis como o ácido ferúlico, têm sido utilizados no tratamento de afecções inflamatórias apresentando efetividade e baixa toxicidade. O ferulato de etila (FE) é um derivado do ácido ferúlico, um fenilpropanóide com atividades anti-inflamatória e antioxidante. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-inflamatória do FE em modelos experimentais de inflamação e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta. Para isso, foram utilizados ratos Wistar (150-210 g) e camundongos (20-30 g), machos e fêmeas. O modelo de edema de pata induzido por carragenina (1%; 0,1 mL) foi utilizado para avaliar a atividade anti-edematogênica do FE, seguido pela elucidação dos mecanismos de ação através da contagem total de leucócitos, atividade de mieloperoxidase (MPO), concentração do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), níveis de citocinas ( $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ ), avaliação da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase e concentração de tióis totais e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em modelo de bolsa de ar subcutânea ativada por carragenina. A avaliação da atividade anti-inflamatória aguda, induzida por carragenina, e crônica, induzida por adjuvante completo de Freund (ACF), do FE foram realizadas através de avaliações do edema articular e tempo de elevação da pata (TEP) em incapacitômetro. O registro radiográfico da articulação com monoartrite induzida por ACF foi coletado no dia da indução e após 7 e 14 dias. Ao fim dos 14 dias de protocolo, estômago, coração, rins e fígado foram retirados para acesso a sinais de gastrolesividade, e toxicidade cardíaca, hepática e renal. O FE 25, 50 e 100 mg/kg *v.o* reduziu o edema de pata ( $p < 0,001$ ) induzido por carragenina da 1ª a 5ª hora nas doses de 50 e 100 mg/kg *v.o*. FE 50 e 100 mg/kg *v.o* inibiu a migração de leucócitos em modelo de bolsa de ar ( $p < 0,001$ ) bem como diminuiu a atividade da mieloperoxidase ( $p < 0,001$ ), SOD, catalase; aumentou as concentrações de tióis totais e diminuiu as concentrações de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$ , NO e TBARS. Na monoartrite induzida por carragenina e ACF o FE 50 e 100 mg/kg, *v.o* reduziu significativamente o edema e o TEP já na segunda hora após a indução ( $p < 0,001$ ). FE apresentou-se como condroprotetor nos registros radiográficos nas doses de 50 e 100 mg/kg, *v.o* ( $p < 0,001$ ). Não houve indícios de gastrolesividade ou toxicidade renal hepática ou cardíaca aparente. Os dados obtidos sugerem que o ferulato de etila exerce atividade anti-inflamatória através da inibição da migração leucocitária, do estresse oxidativo e da inibição de citocinas pró-inflamatórias.

**Palavras-chave:** Ferulato de etila. Fenilpropanóide. Atividade anti-inflamatória. Artrite

CUNHA, F. V. M. Ferulic acid ethyl ester exhibit anti-inflammatory activity via mechanisms antioxidants, inhibiting neutrophil migration and release of  $\alpha$ -fnf proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and. Mastership Dissertation, Post-Graduate Program in Pharmacology, NPPM/CCS/UFPI, 2015.

### ABSTRACT

The inflammation is an adaptive physiologic response triggered by noxious stimuli or conditions as infection and tissue lesion. The resolution of inflammation depends on a complex modulating effect on cell and humoral agents, such as neutrophils, leucocytes, mast cells and prostaglandins, interleukins and production of reactive oxygen and nitrogen species. The drugs used to treat inflammation include non-steroidal anti-inflammatory agents that may be harmful to the gastrointestinal tract and corticosteroids which have several side effects, especially when used chronically. Accordingly, phenylpropanoids rich essential oils such as ferulic acid, have been used in the treatment of inflammatory diseases and show low toxicity. Ferulic acid ethyl ester (FAEE) is a derivate from ferulic acid the latter with known anti-inflammatory action. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory activity of ferulic acid ethyl ester on experimental models of inflammation and the possible mechanisms involved in the response. Wistar rats (150-210 g) and mice (20-30 g) were utilized for these experiment. Carrageenan induced paw edema model (1%; 0.1 ml) was used to assess the anti-inflammatory activity of FAEE, followed by elucidating the mechanisms of action by total leukocyte count, myeloperoxidase activity (MPO), concentration of nitric oxide (NO), cytokine levels (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ), evaluation of the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and concentration of total thiols and thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in the air pouch model of migration actived by carrageenan. To asses the acute, carrageenan induced incapacitation, and the chronic, Complete Freund's Adjuvante (CFA) induced incapacitation, anti-inflammatory activity of FAEE was performed through assessments of joint swelling and time of elevation paw (TEP) in incapacitation test. The radiographic recording of the joints were collected on the day of arthritis induction and 7 and 14 days. Thereafter stomach, heart, kidneys and liver were removed for access to signals ulcerogenic activity, and heart, liver and kidney toxicity after 14 days of protocol. The ferulic acid ethyl ester 25, 50 and 100 mg/kg *v.o* reduced carrageenan induced paw edema ( $p < 0.001$ ) within the first to fiftieth hours. FAEE 50 and 100 mg/kg, *p.o* inhibited leukocyte migration into air pouch model ( $p < 0.001$ ) as well as myeloperoxidase activity ( $p < 0.001$ ), SOD, catalase, increased total thiol concentration and decreased the concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , NO and TBARS. In the carrageenan and CFA induced monoarthritis FAEE 50 e 100 mg/kg, *p.o* significantly reduced the edema and the TEP from second hour after induction ( $p < 0.001$ ). FAEE 50 and 100 mg/kg, *p.o* presented chondroprotective activity in radiographic records ( $p < 0.001$ ). There was no evidence of ulcerogenic activity or hepatic, cardiac or renal toxicity. The data suggest that the ferulic acid ethyl ester exerts anti-inflammatory activity by inhibiting leukocyte migration, oxidative stress and inhibition of pro-inflammatory cytokines.

**Keywords:** Ferulic acid ethyl ester. Phenylpropanoid. Anti-inflammatory activity. Arthritis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação aguda e crônica e os pré-requisitos para a resolução.....	19
<b>Figura 2</b> – Mecanismos e estruturas envolvidas no processo de adesão e migração de células durante o processo inflamatório.....	21
<b>Figura 3</b> – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação crônica.....	24
<b>Figura 4</b> – Estrutura química dos fenilpropanóides.....	32
<b>Figura 5</b> – Estrutura molecular do ferulato de etila.....	34
<b>Figura 6</b> – Incapacitação articular.....	45
<b>Figura 7</b> – Goniômetro de dedo.....	47
<b>Figura 8</b> – Equipamento e posicionamento dos animais para registro radiográfico....	49
<b>Figura 9</b> - Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	53
<b>Figura 10</b> - Efeito do FE no número total de leucócitos em bolsa de ar induzida por carragenina.....	54
<b>Figura 11</b> - Efeito do FE na atividade da mieloperoxidase em bolsa de ar induzida por carragenina.....	55
<b>Figura 12</b> - Efeito do FE nos níveis de IL-1 $\beta$ (A) e TNF- $\alpha$ (B) em bolsa de ar induzida por carragenina.....	56
<b>Figura 13</b> – Efeito do FE sobre a concentração de nitrito (NO $_2^-$ ) em bolsa de ar induzida por carragenina.....	57
<b>Figura 14</b> – Efeito do sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) expressa indiretamente através do percentual de inibição da formação de nitrito (NO $_2^-$ ) em bolsa de ar induzida por carragenina.....	57
<b>Figura 15</b> – Efeito do FE sobre a concentração de glutathiona reduzida expressa expressa em termos de tióis totais em bolsa de ar induzida por carragenina.....	58
<b>Figura 16</b> – Efeito do FE sobre a atividade da enzima catalase em bolsa de ar induzida por carragenina.....	59
<b>Figura 17</b> – Efeito do FE sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em bolsa de ar induzida por carragenina.....	59

<b>Figura 18</b> – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina.....	60
<b>Figura 19</b> - Efeito do FE sobre a variação do ângulo do joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina.....	62
<b>Figura 20</b> – Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina.....	63
<b>Figura 21</b> – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por ACF.....	64
<b>Figura 22</b> - Efeito do FE sobre a variação do ângulo do joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF.....	66
<b>Figura 23</b> – Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF.....	68
<b>Figura 24</b> – Efeito do FE sobre alterações radiográficas em ratos com monoartrite de joelho induzida por ACF.....	69
<b>Figura 25</b> – Efeito do FE sobre alterações radiográficas de joelho de ratos com monoartrite induzida por ACF no dia da indução (D1) e após sete (D7) e 14 dias (D14) de tratamento.....	70
<b>Figura 26</b> – Fotografias representativas da mucosa gástrica de ratos submetidos a tratamento crônico com FE.....	72
<b>Figura 27</b> – Índice de lesão gástrica em animais com monoartrite induzida por ACF tratados por 14 dias com FE.....	72
<b>Figura 28</b> – Efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos expressa como tempo de permanência na barra rotatória.....	73
<b>Figura 29</b> – Efeito do FE sobre a atividade exploratória em camundongos expressa em número de invasões.....	74

## LISTA TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	54
<b>Tabela 2</b> - Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. ....	61
<b>Tabela 3</b> - Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina.....	62
<b>Tabela 4</b> - Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por ACF.....	65
<b>Tabela 5</b> – Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF.....	67
<b>Tabela 6</b> - Efeito do FE sobre o ganho de peso e pesos relativos de fígado, rins e coração em animais com monoartrite induzida por ACF tratados por 14 dias.....	71

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

15-LOX	15 Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AC	Adenilil ciclase
ACF	Adjuvante Completo de Freund
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
APCs	Células apresentadoras de antígenos do inglês " <i>antigen-presenting cells</i> "
AR	Artrite Reumatóide
ARE	Elemento de resposta antioxidante do inglês " <i>antioxidant response element</i> "
COX	Ciclo-oxigenase
DAMP	Padrões moleculares associados à lesão do inglês " <i>damage associated molecular pattern</i> "
DNA	Ácido desoxirribonucléico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial do inglês " <i>endothelial nitric oxide sintase</i> "
ERNs	Espécies reativas derivadas do nitrogênio
EROs	Espécies reativas derivadas do oxigênio
FE	Ferulato de etila
GPCRs	Receptores associados à proteína G do inglês " <i>G protein coupled receptors</i> "
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Receptor de Glicocorticóide do inglês " <i>glicocorticoid recepto</i> "
GRd	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSH	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HMGB1	Grupo de proteínas de alta mobilidade 1 do inglês " <i>hogh mobility group protein 1</i> "
HO-1	Hemi-oxigenase
HSP	Proteínas de choque térmico do inglês " <i>heat shock protein</i> "
ICAM	Molécula de adesão intercelular do inglês " <i>intercelular adhesion molecul</i> "
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a Insulina 1 do inglês " <i>insulin like growth factor</i> "
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível do inglês " <i>inducible nitric oxide sintase</i> "
LFA	Antígeno associado à função do linfócito do inglês " <i>linphocyte function-associated antigen</i> "
LOX-5	Lipoxigenase 5

LPS	Lipopolissacarídeo
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
MAPK	Kinase associada a mitógenos do inglês “ <i>Mitogen-activated protein kinase</i> ”
MCP-1	Proteína quimioatratante de macrófagos do inglês “ <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i> ”
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos do inglês “ <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> ”
mDNA	DNA mitocondrial do inglês “ <i>mitochondrial DNA</i> ”
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	RNA mensageiro
NF-κB	Fator nuclear κB do inglês “ <i>nuclear factor κB</i> ”
NO	Óxido nítrico do inglês “ <i>nitric oxide</i> ”
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NOD	proteína ligante ao domínio de oligomerização de nucleotídeos do inglês “ <i>nucleotide binding oligomerization domain protein like receptors</i> ”
NLR	Receptor semelhante ao NOD do inglês “ <i>NOD like receptors</i> ”
Nrf-2	Fator nuclear derivado do eritróide do inglês “ <i>nuclear factor erythroid 2</i> ”
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos do inglês “ <i>pathogen associated molecular patterns</i> ”
PARs	Receptores ativados por proteases do inglês “ <i>proteases activated receptors</i> ”
PGs	Prostaglandinas
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGJ <sub>2</sub>	Prostaglandina J <sub>2</sub>
PI3k	Fosfatidil inositol 3 cinase
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A2
PLC	Fosfolipase C
SLPI	Fator inibidor da secreção de linfócitos do inglês “ <i>Secretory leukocyte protease inhibitor</i> ”
SOD	Superóxido dismutase

TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico do inglês " <i>thiobarbituric acid reative species</i> "
TEP	Tempo de elevação da pata
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento transformador $\beta$ do inglês " <i>Transforming growth factor beta</i> "
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i> do inglês " <i>Toll-like receptors</i> "
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$ do inglês " <i>tumoral necrosis factor <math>\alpha</math></i> "
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1.1. Processo Inflamatório .....	18
1.2. Inflamação Crônica.....	23
1.3. Estresse Oxidativo e Inflamação.....	25
1.4. Tratamento Farmacológico da Inflamação.....	26
1.5. Plantas Medicinais .....	28
1.6. Óleos essenciais.....	30
1.7. Fenilpropanóides.....	31
1.8. Ferulato de etila.....	34
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1. Geral.....	37
2.2. Específicos.....	37
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. Drogas, reagentes e soluções .....	39
3.2. Ferulato de etila, obtenção e solução .....	39
3.3. Equipamentos .....	39
3.4. Animais.....	40
3.5. Ensaios Farmacológicos .....	40
3.5.1. Avaliação da toxicidade .....	40
3.5.2. Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	41
3.5.3. Efeito do FE sobre a migração celular para bolsa de ar ativada por carragenina.....	41
3.5.4. Efeito do FE sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) .....	42
3.5.5. Avaliação das concentrações de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	42
3.5.6. Concentração do nitrito (NO $_2^-$ ) no exsudato de bolsa de ar subcutânea .....	43
3.5.7. Concentração de superóxido dismutase (SOD) no lavado de bolsa de ar subcutânea.....	43
3.5.8. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no lavado de bolsa de ar subcutânea.....	44

3.5.9. Determinação da atividade da catalase no lavado de bolsa de ar subcutânea .....	44
3.5.10. Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no lavado de bolsa de ar subcutânea .....	44
3.5.11. Avaliação da incapacitação articular .....	45
3.5.12. Avaliação do efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por carragenina.....	46
3.5.13. Avaliação do efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund.....	46
3.5.14. Avaliação da amplitude articular do joelho após indução de artrite por carragenina e ACF .....	47
3.5.15. Mensuração do edema de joelho induzido por carragenina e Adjuvante completo de Freund.....	48
3.5.16. Técnica radiográfica .....	48
3.5.17. Avaliação do ganho de peso, peso dos órgãos e formação de úlceras gástricas em animais com monoartrite induzida por ACF e tratados cronicamente com FE.....	48
3.5.18. Avaliação do efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod.....	50
3.5.19. Avaliação do efeito do FE sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto .....	50
3.5.20. Análise Estatística .....	51
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
4.1. Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina .....	53
4.2. Efeito do FE sobre a migração celular em bolsa de ar ativada por carragenina.....	54
4.3. Efeito do FE sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos.....	55
4.4. Efeito do FE sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos.....	55
4.5. Efeito do FE sobre a concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos .....	56
4.6. Efeito do FE sobre a atividade da SOD em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos.....	57
4.7. Efeito do FE sobre a concentração da Glutathiona reduzida em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina em ratos.....	58
4.8. Efeito do FE sobre a atividade da enzima catalase em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina em ratos .....	58

4.9. Efeito do FE sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos.....	59
4.10. Efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por carragenina .....	60
4.11. Efeito do FE sobre a amplitude articular em modelo de monoartrite induzida por carragenina .....	61
4.12. Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina.....	62
4.13. Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF) .....	63
4.14. Efeito do FE sobre a amplitude articular em modelo de monoartrite induzida por ACF.....	65
4.15. Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund .....	67
4.16. Efeito do FE sobre alterações radiográficas em joelhos de ratos com monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (ACF).....	69
4.17. Ganho de peso e peso dos órgãos em animais com monoartrite induzida por ACF tratados diariamente com FE.....	71
4.18. Atividade ulcerogênica em animais com monoartrite induzida por ACF tratados diariamente com FE.....	71
4.19. Efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod.....	73
4.20. Efeito do FE sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto .....	73
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>129</b>
<b>Apêndice A .....</b>	<b>130</b>

# Introdução

## 1. Introdução

### 1.1. Processo Inflamatório

As referências sobre inflamação remontam do primeiro século D.C quando *Cornelius Celsus* descreveu os quatro sinais cardinais da inflamação: *rubor et tumor cum calore et dolore* (vermelhidão e edema com calor e dor) (MEDZHITOV, 2010). Os sinais e sintomas descritos por *Celsus* persistiram por séculos até terem suas bases fisiológicas esclarecidas por Augustus Waller (1846) e Julius Cohnheim (1867) que descobriram a migração de leucócitos e outras alterações vasculares do processo inflamatório (SCOTT et al, 2004). O quinto sinal cardinal, *functio laesa* (perda de função), foi por fim descrito por Rudolph Virchow em 1858 no livro “Cellular pathologie” (TRACY, 2006).

Após séculos de pesquisas e discussões, a inflamação é conceituada como uma resposta fisiológica adaptativa desencadeada por estímulos nóxicos ou lesão tecidual que visa a restauração da homeostase e o reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008). É um processo que cursa com destruição e reparo tecidual que envolve o recrutamento de derivados do sangue como proteínas plasmáticas e leucócitos, devido às alterações na vasculatura que levam a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento do fluxo sanguíneo (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

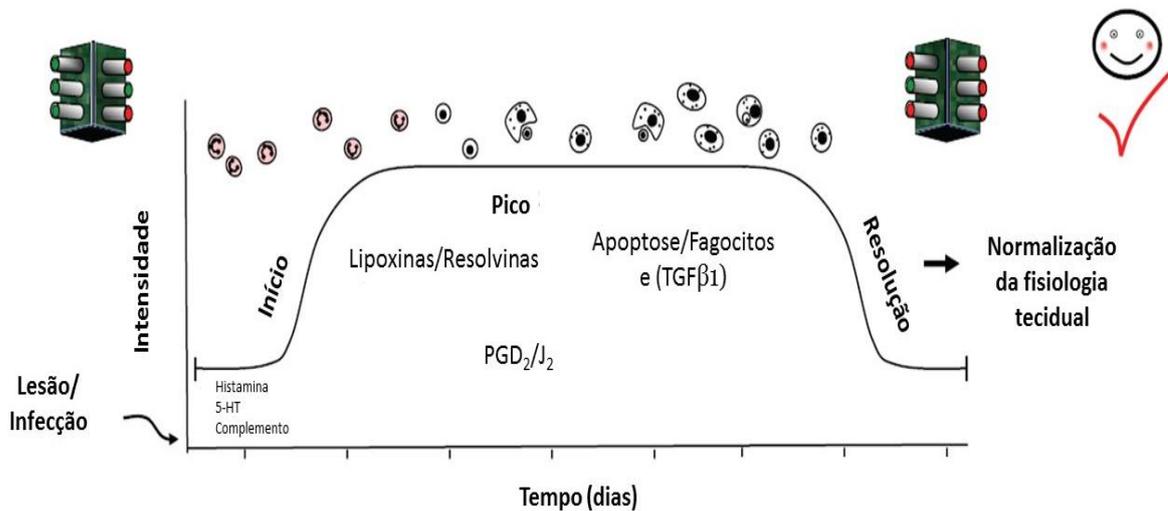
O entendimento do processo inflamatório dá-se de forma mais clara quando abordadas as vias clássicas de lesão inicial, sejam elas química, biológica ou mecânica. Contudo, doenças estreitamente relacionadas à inflamação como diabetes, artrite reumatoide e outras doenças reumáticas, resguardam nuances ainda não compreendidas totalmente que tornam o processo mais complexo (MEDZHITOV, 2008).

Conceitualmente, o processo inflamatório é mediado por efetores celulares (macrófagos, neutrófilos, linfócitos) e químicos (citocinas, quimiocinas, prostanóides, lipoxinas, óxido nítrico) que se somam a fim de eliminar o agente agressor (WHITE, 1999) (**Figura 1**).

Dentre os mediadores da inflamação destacam-se as citocinas, um vasto conjunto de polipeptídios celulares que gerenciam amplamente a resposta inflamatória

através do controle da migração celular e do estado de ativação da célula, através dos seus principais representantes: TNF (Fator de necrose tumoral) e IL-1 (Interleucina 1) (FEGHALI; WRIGHT, 1997). Prostanóides é o nome dado ao grupo constituído por prostaglandinas (PGs) e tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) com ações vasomotoras e quimiotáticas, formados pela ação das isoformas da enzima ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) a partir do ácido araquidônico (AA) proveniente da membrana plasmática por ação da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

**Figura 1** – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação aguda e crônica e os pré-requisitos para a resolução.



Fonte: SERHAN et al, 2007.

O ácido araquidônico pode ainda sofrer ação catalítica da lipoxigenase, 5-LOX ou 15-LOX, e dar origem aos leucotrienos (LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>) que possuem ações pró-inflamatórias direcionadas à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ou lipoxinas que possuem ação pró-fagocítica e apoptótica favorecendo a resolução da inflamação (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

Tais mediadores agem principalmente através da ligação aos receptores associados à proteína G (GPCRs) ou através de clivagem no caso de receptores ativado por proteases (PARs) o que leva a ativação de canais iônicos ou enzimas como adenilil ciclase (AC), fosfolipase C (PLC) e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3k). Adicionalmente, o receptor é fosforilado pelas GPCRs cinases induzindo a ligação do mesmo às arrestinas com consequente internalização e ativação da MAPK (proteínas cinase ativadas por mitógeno) (NEWTON; DIXIT, 2012).

De forma geral, quando desencadeada, a inflamação pode iniciar-se pelo reconhecimento de patógenos por componentes do sistema imune inato, como os receptores *Toll like* (TLR) e NLR (receptor *NOD like*) presentes na superfície de macrófagos e mastócitos residentes (células apresentadoras de antígenos - APCs) ou pela liberação de neuropeptídeos como substância P em resposta a dor em caso de trauma ou lesão tecidual (TEKEUCHI; AKIRA, 2010; KEYEL, 2014; MOTTA et al, 2015).

Os sinais para desencadeamento do processo inflamatório podem ser basicamente de dois tipos: I) PAMPs (do inglês, *pathogen associated molecular patterns*, padrões moleculares associados a patógenos) relacionados à resposta imune inata e consequente inflamação em resposta a lesão de origem biológica; e II) DAMPs (do inglês, *damage associated molecular patterns*, padrões moleculares associados a lesão) que consistem em moléculas próprias do tecido e que, no geral, têm sua existência restrita ao meio intracelular mas que são liberadas mediante lesão física ou química como ácidos nucleicos e determinadas proteínas como o HMGB1 (proteínas de alta mobilidade do grupo B1) (BROGGI; GRANUCCI, 2015).

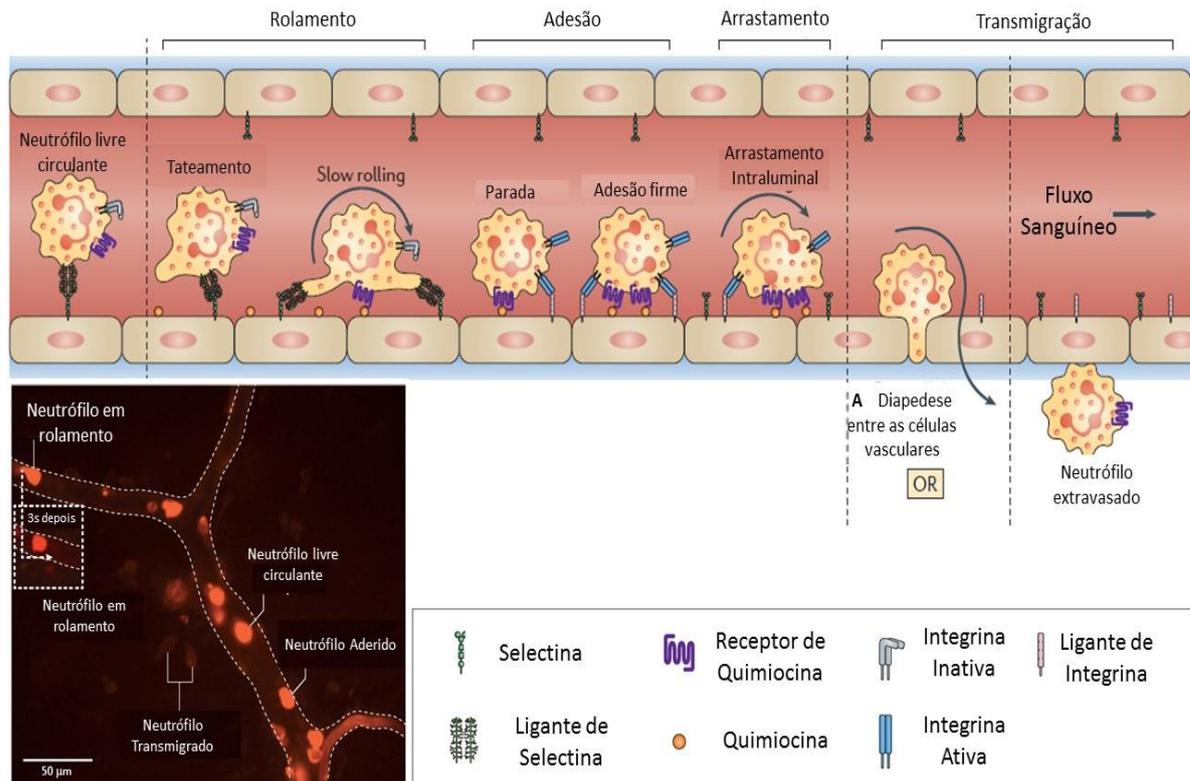
O reconhecimento de PAMPs e DAMPs leva a produção, pelas APCs, de uma variedade de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas, FAP (fator ativador de plaquetas) e eicosanoides, levando ao aumento da permeabilidade capilar, principalmente de vênulas pós-capilares, gerando edema local, quimiotaxia e transmigração de neutrófilos para o foco inflamatório (NATHAN, 2002).

As células do endotélio ativadas possuem permeabilidade seletiva aos leucócitos, não permitindo a passagem de eritrócitos e hemácias, por exemplo. Isso dá-se devido à expressão de moléculas de adesão em suas superfícies (selectinas) que ligam-se seletivamente às integrinas e receptores de quimiocinas presentes na superfície dos leucócitos (MEDZHITOV, 2008).

O processo de transmigração refere-se à passagem de células da circulação sistêmica para o foco da lesão e compreende duas fases distintas, são elas: rolamento e adesão (HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS, 2013). A primeira fase refere-se ao recrutamento de células livres na circulação através da ligação das moléculas de adesão P-selectina e E-selectina expressas nas células endoteliais, aos seus ligantes glicosilados presentes na superfície das células livres, enquanto que a segunda refere-se à ligação firme entre as moléculas LFA-1 (antígeno associado a função do

linfócito do tipo 1) expressas nas células inflamatórias e ICAM-1 e ICAM-2, moléculas de adesão intercelular expressas nas células endoteliais (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013) (Figura 2).

**Figura 2** – Mecanismos e estruturas envolvidas no processo de adesão e migração de células durante o processo inflamatório.



Adaptado de: KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013.

Quando atingem o sítio inflamatório, os leucócitos são ativados pelo contato direto com o deflagrador da resposta inflamatória ou pela ação das citocinas liberadas pelas células residentes. Uma vez ativados, os leucócitos, especificamente os neutrófilos, passam a liberar o conteúdo de seus grânulos que inclui radicais livres, proteinase 3, catepsina G e elastase, a fim de eliminar o patógeno ou tecido lesado (SERHAN et al, 2007).

Os neutrófilos transmigraados expressam a enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) e portanto, dão origem a leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Contrariamente, as células do tecido expressam a enzima 15-LOX (15-Lipoxigenase) que a partir do ácido araquidônico geram lipoxinas, moléculas estas com atividade anti-inflamatória. Adicionalmente, os neutrófilos produzem ainda um intermediário dos leucotrienos, o

leucotrieno A<sub>4</sub>, o qual é captado pelas células teciduais que expressam a 15-LOX e o converte a lipoxinas (GILROY et al, 2004).

Quase que simultaneamente aos eventos acima descritos, os macrófagos passam a expressar ciclo-oxigenase-2 (COX-2) devido a ação de citocinas e proteínas microbianas, o qual converte ácido araquidônico em PGE<sub>2</sub> (Prostaglandina E<sub>2</sub>) (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Esta por sua vez, aumenta a permeabilidade do tecido às células inflamatórias e à medida que sua concentração aumenta, diminui a expressão de COX-2 e 5-LOX e aumenta a 15-LOX por mecanismos de *feedback* positivo e negativo, respectivamente (WILLOUGHBY et al, 2000).

O êxito do processo inflamatório reside na eliminação do agente causal que, uma vez eliminado, dá início ao processo de reparo tecidual o qual é mediado principalmente por macrófagos residentes e recrutados da circulação (NATHAN; DING, 2010). Mediadores como as lipoxinas, protectinas, resolvinas, TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformador  $\beta$ ), interleucinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10 principalmente), SLPI (protease inibidora da secreção de leucócitos), HSP (proteínas de choque térmico), são fundamentais nesta fase do processo por recrutarem monócitos que removem as células mortas e iniciam o processo de reparo tecidual (JANSSEN; HENSON, 2012). Após liberação de SLPI no sítio da inflamação, neutrófilos novos chegam ao local e os ativos durante o processo inflamatório sofrem apoptose e fagocitose pelos macrófagos, aumentando a produção de TGF- $\beta$ . Estas células sob ação de TNF- $\alpha$  produzem IL-12 que por sua vez induz linfócitos a liberar IFN- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) o qual amplifica a produção de quimiocinas pelos macrófagos atraindo mais monócitos ao local da lesão para remoção dos debris e células apoptóticas, culminando com o fim da inflamação e início do processo de reparo tecidual (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

A magnitude da resposta inflamatória é fator preponderante para resolução ou cronificação da inflamação: resposta insuficiente resulta em imunodeficiência o que pode resultar em câncer; resposta excessiva pode causar morbidade e mortalidade em doenças como artrite reumatoide, doença de Crohn, aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia cerebral e miocárdica, nesses casos, a inflamação pode ser mais letal que o agente causal (TRACEY, 2002).

## 1.2. Inflamação Crônica

Quando o processo inflamatório falha na eliminação do invasor ou agente causal, o mesmo persiste e agrega outras características como a substituição dos tipos celulares de polimorfonucleadas para mononucleadas, representadas principalmente por macrófagos e linfócitos T (LAWRENCE; GILROY, 2007). Dessa forma, a inflamação crônica surge pela falha da resolução do processo inflamatório (MURAKAMI; HIRANO, 2012).

Muito embora haja diversidade da evolução clínica de doenças como aterosclerose, artrite reumatoide, cirrose hepática, artrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras, os mecanismos e os mediadores são semelhantes, cada doença conservando, obviamente, sua peculiaridade (LIBBY, 2007).

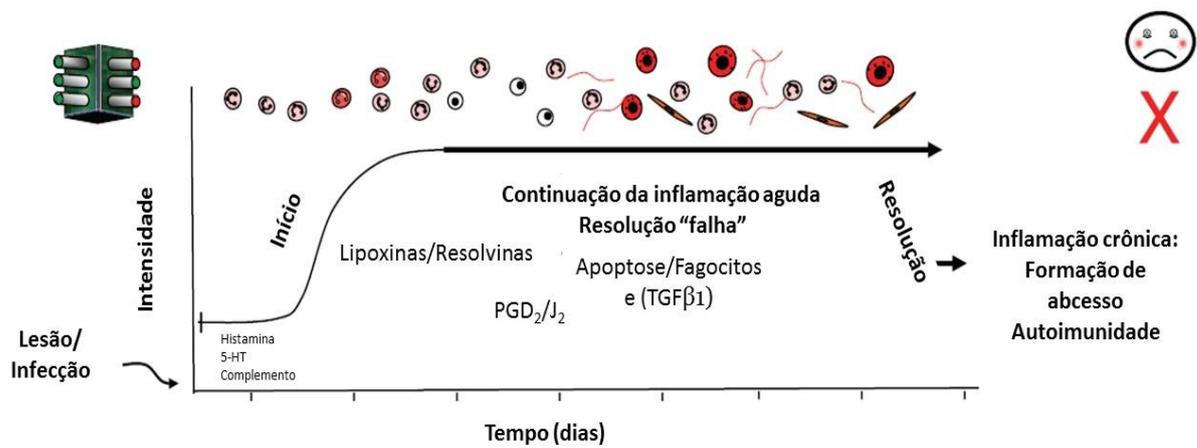
Os custos para o tratamento de doenças inflamatórias são diretamente proporcionais à duração, magnitude e localização do processo inflamatório. Dessa forma, quanto mais prolongada, maior a intensidade e quantidade de segmentos corpóreos envolvidos e maiores são os gastos com tratamento (ASHLEY; WEIL; NELSON, 2012).

Como dito anteriormente, a substituição de células polimorfonucleadas por mononucleadas (Linfócitos T e macrófagos) é uma marca da inflamação crônica (MEDZHITOV, 2008). A IL-6 parece ser a principal citocina responsável por essa mudança no perfil celular. A exposição de células endoteliais à IL-6 leva a produção de MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos do tipo 1) e expressão de moléculas de adesão, além disso, neutrófilos expostos por longos períodos a citocinas também liberam MCP-1, favorecendo assim a quimiotaxia e a migração de monócitos ao sítio inflamatório (GABAY, 2006). Uma vez transmigrados, os monócitos passam a liberar o fator pró-mitogênico M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) que induz sua diferenciação em macrófagos e induzem a proliferação celular (LIBBY, 2007) (**Figura 3**).

Outras alterações relacionadas à inflamação crônica são remodelamento da matriz extracelular mediada principalmente por fibroblastos, morte ou proliferação celular caracterizada ora por regiões de tecido evanescente ora necrótico, e angiogênese culminando com a diminuição da função do tecido (FERRERO-MILLANI et al, 2006).

Importância tem sido atribuída aos TLRs presentes em células T e macrófagos: quando ativados por TLRs, os macrófagos fagocitam debris teciduais e agentes biológicos remanescentes; as células T entretanto, são inibidas diante da ligação aos seus receptores *Toll like* e, apenas na ausência do estímulo, são ativadas e passam a liberar IL-10, importante citocina anti-inflamatória (SEHRAN, 2007).

**Figura 3** – Representação esquemática dos eventos envolvidos na inflamação crônica.



Fonte: SERHAN et al, 2007.

As lipoxinas, como discutido anteriormente, possuem marcante atividade anti-inflamatória, o que vem sendo reportado em estudos que abordam doenças inflamatórias crônicas: i) o aumento da quantidade de lipoxinas no sítio da inflamação leva à resolução da mesma e ii) em modelos de inflamação crônica observam-se baixos níveis de lipoxinas, ressaltando sua importância na sinalização para resolução do processo inflamatório e início do reparo tecidual (KANTARCI; VAN DYKE, 2003). Além disso, outro grupo de moléculas, as HSP, especialmente a família HSP90, desempenham importante papel na gênese da inflamação crônica, induzindo migração de linfócitos T para o sítio inflamatório e a liberação de IL-10 por monócitos (EDEN; VAN DER ZEE; PRAKKE, 2005).

A falha nos processos de finalização da inflamação e início do reparo tecidual propiciam o aumento da lesão tissular pela formação de tecido de granulação e acúmulo de células com capacidade secretória (enzimas e radicais livres), que por sua vez retroalimentam positivamente a inflamação local (NATHAN; DING, 2010).

### 1.3. Estresse Oxidativo e Inflamação

O estresse oxidativo está envolvido em diversas doenças crônicas inflamatórias tais como artrite reumatoide (AR), lúpus, fibrose pulmonar, aterosclerose, lesão por isquemia e reperfusão dentre outras (BRIEGER et al, 2012). Estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes (radicais livres), favorável ao segundo (DALLE-DONE et al, 2006). Radicais livres são moléculas ou fragmentos de moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais moleculares, e que obtêm estabilidade removendo elétrons de outras moléculas. As duas principais famílias de radicais livres são as derivadas do oxigênio e as derivadas do nitrogênio (LUGRIN et al, 2014).

Espécies reativas do oxigênio (EROs) são produtos da respiração celular e incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e a hidroxila ( $OH^-$ ) (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Historicamente, tais radicais foram tratados apenas como agentes lesivos, entretanto, sabe-se hoje da importância dos mesmos na sinalização de fatores de crescimento, transdução do sinal hipóxico, respostas imunes bem como participação nas alterações vasculares do processo inflamatório e da dor (RECZEK; CHANDEL, 2015). Já as espécies reativas derivadas do nitrogênio (ERNs) são uma variedade de moléculas contendo nitrogênio que tipicamente derivam da cascata de produção do óxido nítrico (NO) pelas óxido nítrico sintases (NOS) a partir da L-arginina, e compreendem o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) e a nitroxila (HNO) (MATALON; DAVIS; JANG JR, 2007). As ERNs têm sido apontadas como mediadores importantes na indução de alterações vasculares e mediação da dor inflamatória (LITTLE; DOYLE; SALVEMINI, 2012).

A manutenção da homeostasia redox é realizada por sistemas tampões os quais incluem pequenas moléculas e tampões protéicos (BANERJEE, 2012). O equilíbrio desses sistemas tampões, por sua vez, é mantido por enzimas antioxidantes incluindo superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase e tioredoxina redutase, bem como antioxidantes não enzimáticos como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C),  $\beta$ -caroteno, dentre outros (LUGRIN et al, 2014). Diante de um estresse oxidativo, através do sistema de sinalização Keap1-Nrf2 (fator nuclear E2) há aumento da transcrição de enzimas antioxidantes por intermédio do ARE (elemento de resposta antioxidante), e tal controle é estreito possuindo vias de regulação bidirecionais (NGUYEN; NIONI; PICKETT, 2009).

O estresse oxidativo/nitrativo resulta em alteração dos lipídios de membrana, proteínas, RNA e DNA levando a alterações funcionais da célula com posterior apoptose (FORMAN; TORRES, 2001). Tal evento pode surgir em três situações distintas: i) aumento da concentração de ERNs e EROs, ii) depleção dos mecanismos antioxidantes, e iii) indução de enzimas endógenas que produzem radicais livres como a NADPH oxidase e a iNOS (óxido nítrico sintase induzível ou do tipo 2), expressa em processos inflamatórios agudos e crônicos importantes na indução das alterações vasculares (KVIETYS; GRANGER, 2012; KALYANARAMAN, 2013).

Em todos os sistemas orgânicos, as EROs e ERNs desempenham papel fundamental no agravamento dos processos inflamatórios crônicos agindo tanto diretamente, como agentes lesivos, quanto indiretamente induzindo a transcrição de fatores pro-inflamatórios e pró-apoptóticos (HENROTIN; KURZ; AIGNER, 2005; AFONSO; CHAMPY; BARTOSZ, 2009). Nas articulações, em doenças como a artrite reumatoide e a artrose, esses agentes podem ser produzidos por macrófagos e neutrófilos ativados na membrana sinovial e condrócitos (ROBERTS et al, 2010).

Os radicais livres presentes no líquido sinovial são os responsáveis pela perda de tecido cartilaginoso em articulações artríticas e artrósicas devido à morte celular em decorrência de lesões nucleicas irreversíveis (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; GRISHKO; HO; WILSON et al, 2009; SALVEMINI et al, 2011).

Diante das funções desempenhadas pelos radicais livres em condições inflamatórias, é crescente a investigação de agentes antioxidantes para tratamento de doenças inflamatórias sejam agudas ou crônicas (LI et al, 2013).

#### **1.4. Tratamento Farmacológico da Inflamação**

Os anti-inflamatórios têm sido utilizados com sucesso para alívio da dor, inflamação e febre há mais de 3500 anos, e continuam a ser utilizados por milhões de pacientes ao redor do mundo (VONKEMAN; VAN DE LAR, 2010). Muitas classes de fármacos como corticosteroides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) com diferentes afinidades às isoformas da ciclooxigenase (COX) são utilizados para tratar distúrbios inflamatórios. Entretanto, a utilização desses fármacos causam uma série de efeitos indesejáveis tais como úlceras gástricas, dispepsia, sangramentos gastrintestinais e complicações cardiovasculares (GILROY et al, 2004; GAUTAM; JACHAK, 2009; DINARELLO, 2010).

Os corticosteroides são anti-inflamatórios eficazes em basicamente todas as doenças inflamatórias e alérgicas. A efetividade extensiva dessa categoria de drogas advém da ação pleiotrópica da ativação de seu receptor (GR – receptor de glicocorticoide) em múltiplas vias de sinalização (RHEN; CIDLOWSKI, 2005). Dessa forma, podem atuar desde a inibição da produção de prostaglandinas, da vasodilatação e da permeabilidade vascular, além da transmigração de leucócitos ao sítio inflamatório (NEWTON, 2000). O pleiotropismo, porém, resulta em diversos efeitos adversos tais como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão arterial sistêmica, inibição do reparo de feridas, osteoporose e distúrbios metabólicos, principalmente quando administrados cronicamente (NARUM; WESTERGREN; KLEMP, 2014).

Os anti-inflamatórios não esteroides são a principal modalidade terapêutica de afecções inflamatórias e artríticas (LANE et al, 2008). Na Europa, em 2004, os AINEs representaram 7,7% das prescrições (SOSTRES et al, 2010). Apesar de representarem grupo heterogêneo quanto à estrutura química, farmacocinética e farmacodinâmica, os AINEs carregam consigo mecanismo de ação semelhante: inibem a produção de prostaglandinas pelo bloqueio da COX resultando em efeitos analgésico, antipirético e anti-inflamatório (VONKEMAN; VAN DE LAR, 2010).

A COX apresenta três isoformas sendo a COX-1 e COX-2 relevantes no tratamento farmacológico da inflamação. A primeira está constitutivamente expressa na maioria dos tecidos enquanto que a COX-2 tem sua expressão condicionada a estímulos por citocinas, lipopolissacarídeos e fatores de crescimento, dentre outros (HOWARD; DELAFONTAINE, 2004; PERRONE et al, 2010). A inibição das isoformas da COX pode resultar em efeitos deletérios, especialmente nos tecidos e órgãos onde seus produtos (PGE<sub>2</sub>) são protetores, como o trato gastrointestinal e rins (SOSTRES et al, 2010).

Estima-se que 20-30% dos pacientes em uso regular de AINEs desenvolvam algum tipo de dispepsia ou lesão gástrica (JONES et al, 2008). As mucosas gástricas e duodenais são ricas em prostaglandinas que exercem papel protetor no trato gastrointestinal, provendo adequada perfusão à mucosa, secreção de bicarbonato pelas células epiteliais, secreção de muco e manutenção do pH neutro da mucosa (RADI; KHAN, 2006). A inibição da COX e conseqüente diminuição da concentração de PGs culminam com o aumento da susceptibilidade à lesão do TGI (VAN SCHOOR, 2014). Adicionalmente, tanto os inibidores da COX-1 quanto da COX-2 podem causar

nefrotoxicidade com necrose papilar e nefrite intersticial (BING; LOMNICKA, 2002). Diante de tais problemas relacionados ao uso de inibidores da COX-1, bem como a descoberta de uma segunda isoforma da COX, a COX-2, estritamente relacionada ao processo inflamatório e pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de drogas específicas a sua inibição, surgiram os coxibes (LANE et al, 2008).

Os coxibes representaram a primeira classe de AINEs desenvolvidos com base em estudos racionais a fim de diminuir os efeitos gastrintestinais provocados por fármacos com maior afinidade à COX-1 (PATRONO; ROCCA, 2009). Seu lançamento no mercado em meados da década de 1990 trouxe euforia à comunidade médica devido à sua maior afinidade à COX-2 e conseqüente menor toxicidade gastrintestinal (JONES et al, 2008). A descoberta dos efeitos tóxicos cardiovasculares incluindo infarto agudo do miocárdio e alterações trombóticas culminaram com a retirada do mercado do rofecoxibe (WARNER; MITCHELL, 2008). A inibição da COX-2 favorece os eventos pro-trombóticos pelo desequilíbrio entre as concentrações de prostaciclina e tromboxanos, resultando na diminuição da concentração de prostaciclina preferencialmente produzidas pela COX-2 (ZARRAGA; SCHWARS, 2007; PATRONO; ROCCA, 2009).

Diante de tais inconvenientes, a busca por drogas dotadas de eficácia terapêutica associada ao desprovimento de toxicidade e efeitos adversos faz-se necessária (MISHRA; TIWARI, 2011). Devido à experenciação cultural e riqueza de entidades químicas com atividade biológica, as plantas medicinais e o acervo etnofarmacológico são as fontes de pesquisa mais comuns (OLIVEIRA et al, 2012).

### **1.5. Plantas Medicinais**

Ao longo da história, o homem recorreu à natureza para prover suas principais necessidades: comida, vestimentas, fragrâncias, fertilizantes e medicamentos, especialmente através do uso de plantas medicinais (GURIB-FAKIM, 2006).

De acordo com Rates (2001) uma planta medicinal é qualquer planta utilizada diretamente ou como fonte de uma droga para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou alterar os estados fisiológico ou patológico do processo saúde-doença. Nesse sentido, chás, pós, tinturas e outras formas de preparações herbais eram utilizadas para tratamento das mais diversas enfermidades (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Boa parte deste conhecimento adveio do empirismo, da simples observação da natureza,

da formulação de hipóteses: prova deste fato é que gorilas, chimpanzés, macacos e humanos utilizam-se das mesmas plantas medicinais para tratar distúrbios semelhantes (HALBERSTEIN, 2005).

Após o advento do método científico, tais plantas passaram a ser testadas seja em estudos de campo, estudos clínicos ou análises laboratoriais, e a lista de espécies a serem investigadas continua a crescer (BALUNAS; KINGHORN, 2005; HALBERSTEIN, 2005). Aproximadamente metade (125.000) das espécies de plantas do mundo encontram-se nas florestas tropicais, tornando-as o berço de potenciais fármacos para uso medicinal (GURIB-FAKIM, 2006).

Entre 1970 e 2006 apenas 24 substâncias de origem natural foram aprovadas para produção e comercialização como medicamentos o que vai de contrassenso aos dados indicativos de que 52% de um total de 1184 novas entidades químicas descobertas no período de 1981 a junho de 2006 eram de origem natural e apenas 30% puramente sintéticas (GANESAN, 2008). De acordo com Balunas e Kinghorn (2005), apenas uma a cada cinco mil substâncias isoladas chegarão a fase de ensaios clínicos em humanos e será aprovada para uso. Ainda segundo estes autores, o percurso da descoberta e isolamento da substância até sua aprovação e uso é árduo e dispendioso, perdurando em média 10 anos e alcançando montante de 800 milhões de dólares.

Problemas relacionados à baixa solubilidade, absorção e biodisponibilidade podem limitar o desenvolvimento de fármacos a base de produtos naturais (GANESAN, 2008). De acordo com Richton (2008), não apenas no isolamento e descoberta de substâncias bioativas com fins medicinais baseia-se o estudo das plantas: problemas relacionados a farmacocinética ou efeitos adversos podem ser contornados com modificações na estrutura da substância, ou a mesma pode ser utilizada como modelo para desenvolvimento de fármacos sintéticos com efeitos similares (por exemplo: ácido salicílico, aspirina; ibuprofeno, acetaminofeno e naproxeno; as penicilinas; morfina e naltrexona). Ressalta-se que, por vezes, a substância isolada apresenta efeito farmacológico inferior ao extrato que lhe deu origem o que é justificado pela ausência das relações de sinergismo com outras substâncias presentes no extrato (GOSSLAU et al, 2011).

Apesar do aumento de fármacos sintéticos, as substâncias de origem natural persistem como o tratamento de escolha para múltiplas doenças ao redor do mundo, (CORDELL, 2000; HALBERSTEIN, 2005) além do uso em perfumes, cosméticos e

flavorizantes de alimentos (EDRIS, 2007). No plano medicamentoso, múltiplos efeitos têm sido confirmados como anticâncer, antiaterosclerótico, antitrombótico, anti-hipertensivo, antibiótico e antiviral, antidiabético e anti-inflamatório (RATES, 2001). Associado às suas atividades terapêuticas, soma-se a baixa incidência de efeitos adversos, fator preponderante para aumento da adesão do paciente ao tratamento (GOSSLAU et al, 2011).

Dentro deste contexto, diversas famílias (Zingiberaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Ginkgoaceae, Iriaceae) têm demonstrado efeito inibidor da inflamação através da inibição de vias importantes de sinalização como a do ácido araquidônico, NF-κB e a via do óxido nítrico (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003) além da ciclooxigenase 2 pelas plantas da família Apocynaceae, Asteraceae e Laminiaceae (SHAH; SETH; MAHESHWARI, 2011). Vantagem adicional aos produtos naturais em relação ao tratamento químico convencional é a ação multifocal daqueles na cascata inflamatória, ou seja, apesar de apresentarem efeitos menores em diferentes etapas da cascata inflamatória, o somatório dos efeitos tende a ser maior que a ação focal dos fármacos sintéticos convencionais contribuindo, inclusive, para o aparecimento de menos efeitos adversos (GOSSLAU et al, 2011).

Dessa forma, a pesquisa de plantas e substâncias de origem natural com atividade anti-inflamatória torna-se importante fonte de possíveis medicamentos (YUAN, 2006). Composto por importantes classes de substâncias com atividades anti-inflamatória e anti-oxidante, os óleos essenciais, figuram entre as fontes mais comuns de pesquisa de agentes dessa natureza (SOUSA, 2011).

## **1.6. Óleos essenciais**

Óleos essenciais são misturas de constituintes voláteis de origem natural produzidos como metabólitos secundários de plantas aromáticas, com baixo peso molecular (até 500 Dáltons), caracterizados por forte odor e obtidos por hidrodestilação ou a vapor, ou por processo mecânico ou destilação a seco (BAKKALI; AVERBECK; AVERBECK; IDAOMAR, 2008; TUREK; STINTZING, 2012). Apresentam-se no estado líquido com aspecto límpido e raramente colorido, são lipofílicos e com densidade, geralmente, menor que a água (BAKKALI; AVERBECK; AVERBECK; IDAOMAR, 2008). Os óleos essenciais são um dos produtos mais importantes para a indústria devido sua ampla utilização como flavorizantes de

alimentos, bebidas, perfumaria, medicamentos e cosméticos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).

Um óleo essencial pode conter de 20 a 100 diferentes metabólitos secundários e sua atividade biológica pode ser determinada pelo constituinte majoritário ou por ações sinérgicas entre seus constituintes (TUREK; STINTZING, 2012).

Diversos fatores como variação genética, variedade vegetal, nutrição, utilização de fertilizantes, localização geográfica, variação climática, estações do ano, estresse e condições de estocagem e armazenamento dos óleos após extração, podem alterar sua composição química (TUREK; STINTZING, 2012; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Além disso, o método de extração e a parte da planta utilizada determinam os constituintes do óleo e conseqüentemente sua atividade biológica (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Apenas a atividade antioxidante dos constituintes dos óleos essenciais justifica a atividade anti-inflamatória e analgésica agregada (SOUSA, 2011). Entretanto, ações adicionais como inibição da via do ácido araquidônico, 5-LOX, COX-2, iNOS, NF-κB, via das MAP cinases e inibição da transcrição de fatores pró-inflamatórios têm sido demonstrados para os óleos essenciais de diversas plantas como *Aloe barbadensis* Miller, *Cordia verbenacea* DC, *Lavandula officinalis* Chaix, *Eucalyptus globulus* Labill, *Citrus bergamia* Risso dentre outras (MIGUEL, 2010).

Os óleos essenciais têm sido apontados como importantes antioxidantes devido à atividade tamponadora de radicais livres de seus constituintes fenólicos (fenilpropanóides, flavonoides e terpenóides) que agem seja por via direta, ao ligar-se com o próprio radical livre ou de maneira indireta, ao quelar metais importantes para o processo de produção do radical livre, e portanto, têm sido propostos na terapêutica da doença de Alzheimer, câncer, diabetes, asma, doença de Parkinson e inflamação (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

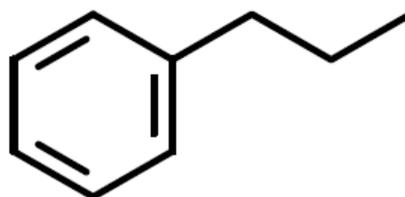
### **1.7. Fenilpropanóides**

As plantas, assim como os demais organismos vivos, produzem grande variedade de metabólitos primários e secundários. Os primários são destinados a prover energia, permitir o crescimento e a reprodução, e são essenciais à vida. Já os secundários, apesar de não estarem diretamente relacionados aos processos dos

metabólitos primários, desenvolvem importantes funções adaptativas e protetoras que favorecem a sobrevivência e propagação da espécie, tais como: proteção contra patógenos (vírus, micoplasma, bactérias e fungos), contra predadores (insetos, mamíferos), contra plantas competidoras e estresses externos (radiação ultravioleta, ozônio), além disso, podem exercer a função de atração de espécies polinizadoras e dispersoras de sementes (KORKINA, 2007; SÁ et al, 2014).

Os metabólitos secundários derivam do metabolismo primário de todos os aminoácidos e carboidratos através de processos de síntese como metilação, glicolização, acilação, fenilação, oxidação e redução através de vias metabólicas específicas (glicólise, fotossíntese, ciclo do citrato, via chiquimato dentre outros) (SÁ et al, 2014). Dentre as várias classes de metabólitos secundários, a maior é a dos fenilpropanóides (KORKINA, 2007; VOGT, 2010). Tais substâncias consistem em um anel fenólico ligado a uma cadeia alquil, geralmente de três carbonos, de onde deriva o nome “fenilpropanóide” (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Esta estrutura pode ainda ter substituintes ligados ao anel fenólico (alquilas e hidroxilas especialmente) ou ainda combinações da estrutura básica, formando oligômeros com estrutura (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)<sub>n</sub> (HARMATHA et al, 2011) (**Figura 4**). São sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico, a posterior redução do grupo carboxila deste gera um aldeído (cinamaldeído) e reduções subsequentes monolignóis (fenilpropenos: eugenol e safrol) (VOGT, 2010; SÁ et al, 2014).

**Figura 4** – Estrutura química dos fenilpropanóides.



Adaptado de: Sá et al, 2014.

Os fenilpropanóides e seus derivados estão entre os componentes ativos mais comuns de alimentos, aromas, fragrâncias, vinhos óleos essenciais, cervejas e diversos segmentos da medicina tradicional chinesa (VOGT, 2010; SÁ et al, 2014).

Segundo Kurkin (2003), os fenilpropanóides podem ser divididos em três grandes grupos e subdivididos em classes, são eles: fenilpropanóides simples que engloba as classes dos cinamoil álcoois e seus derivados, os ácidos cinâmicos e seus derivados (ésteres e glicosídeos), cinamaldeídos e fenilpropanos; o grupo dos fenilpropanóides complexos que abrange os fenilpropanóides glicosilados e as lignanas; e o terceiro grupo representado pelos fenilpropanóides geneticamente relacionados (flavonoides e cumarinas). Ainda segundo o autor, referente às atividades biológicas, os derivados dos cinamoil álcoois e do ácido cinâmico são os mais relevantes para estudo.

Tendo em vista as numerosas funções protetoras dos fenilpropanóides nas plantas, essas substâncias são de grande interesse especialmente para o desenvolvimento de produtos medicinais com finalidades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticâncer, antivirais, cicatrização de feridas, antibióticas e como protetores aos raios UVB (KORKINA, 2007; SÁ et al, 2014). Dentre as aplicações medicinais destaca-se o uso como anti-inflamatórios. Tal uso vem sendo descrito nos últimos anos e os mecanismos pelos quais este efeito se dá têm sido elucidados.

Segundo Korkina et al (2011), os fenilpropanóides exercem importante atividade anti-inflamatória pois atuam em todas as frentes possíveis: inibição da expressão de enzimas pro-inflamatórias (COX-2, LOX-5, iNOS, NADPH-oxidase e PLA<sub>2</sub>), nas vias de transdução de sinal da resposta inflamatória (NF-κB, AP-1, Akt e ERK), inibição de receptores e transcrição de genes (PPARS e ARE) e principalmente por combater os mediadores não proteicos da inflamação como radicais livres (EROS e ERNS) e produtos da peroxidação lipídica (NATARAJAN et al, 1996; MICHALUART et al, 1999; SONG et al, 2002; ESTROV et al, 2003; GAUTAM; JACHAK, 2009; SÁ et al, 2014). Tais achados têm sustentado a pesquisa e uso de fenilpropanóides como agentes anti-inflamatórios.

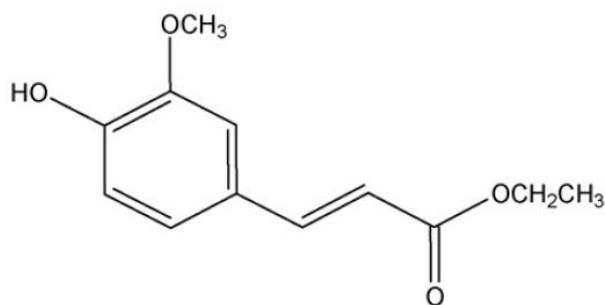
Vários fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico como o ácido caféico, curcumina, ácido ferúlico, dentre outros, possuem atividades antioxidante e anti-inflamatória bem documentadas (KORKINA et al, 2011). O ácido ferúlico apresentou atividade anti-inflamatória e antioxidante *in vitro*, mas devido a sua baixa lipofilicidade não expressou os mesmos resultados *in vivo*, apresentando pequena biodisponibilidade e estabilidade (SCAPAGNINI et al, 2004). Diante de dificuldades farmacocinéticas, e farmacodinâmicas faz-se necessária a modificação estrutural a fim de preservar os efeitos farmacológicos e ao mesmo tempo melhorar o perfil de

absorção, distribuição e especificidade da substância (GAUTAM; JACHAK, 2009). Os análogos estruturais do ácido caféico, por exemplo, possuem potencial antioxidante crescente de acordo com o número de doadores de hidrogênio que possuem em suas estruturas tais como grupos hidroxila ( $-OH$ ), catecol e sulfidril (-SH) (SON et al, 2002). De modo concernente, os derivados estéricos do ácido ferúlico, como o ferulato de etila, possuem maior poder antioxidante evidenciando a importância da modificação na molécula (ANSELMi et al, 2004).

### 1.8. Ferulato de etila

O ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato) ( $C_{12}H_{14}O_4$ ), um fenilpropanóide, é um derivado do ácido ferúlico amplamente presente em vegetais e especialmente em grãos como arroz e milho (ZHANG et al, 2010) (**Figura 5**). À classe constituída por derivados esterificados do ácido ferúlico dá-se o nome de fitoésteres ferulatos, da qual o ferulato de etila faz parte (ZHANG et al, 2010). Com peso molecular de 222,24 daltons, pKa de 9,98 e maior polaridade entre os derivados estéricos do ácido ferúlico (log P de 2,24), o ferulato de etila, apesar de possuir poucos substituintes antioxidantes no anel aromático e na cadeia lateral alquila, possui boa permeabilidade nas membranas biológicas, justificando assim seu melhor perfil antioxidante em relação ao ácido ferúlico (NENADIS; ZHANG; TSIMIDOU, 2003). A avaliação da seletividade epiderme-derme confirma a maior capacidade de penetração do ferulato de etila, que apresentou taxa de absorção transdérmica de 22 a 51 vezes maior que seu precursor, o ácido ferúlico, em pH de 6,0 e 9,9 respectivamente (ZHANG et al, 2010).

**Figura 5** – Estrutura molecular do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato).



Adaptado de ZHANG et al, 2010.

A presença do grupo éster no ferulato de etila atribui-lhe maior lipofilidade em relação ao seu correlato, o ácido ferúlico, atribuindo-lhe maior capacidade de permeio nas barreiras biológicas (SULTANA, 2012). A farmacocinética do ferulato de etila é pouco conhecida, mas acredita-se que esta substância seja clivada ou por ação da microflora intestinal ou mesmo por enzimas plasmáticas e hepáticas dando assim origem ao seu precursor que sofre conjugação e por fim é eliminado através da urina e fezes (BOLLING et al, 2011).

Estudos têm demonstrado que os derivados estéricos do ácido ferúlico exercem atividade tamponadora de radicais livres e preventiva na formação dos mesmos principalmente através do aumento na expressão de proteínas antioxidantes como glutathione. Os mecanismos envolvidos em tal resposta relacionam-se a ativação da via do Nrf-2 e inibição do NF- $\kappa$ B (SULTANA, 2012). Outros efeitos importantes relacionados a atividade anti-inflamatória incluem a inibição do NF- $\kappa$ B, da COX-2 e da iNOS (ISLAM et al, 2009), indução da quinona redutase (BOLLING et al, 2011), aumento da expressão da HO-1 (enzima hemeoxigenase) e da proteína HSP-70 (CALABRESE et al, 2008).

Quanto à toxicidade, a maioria dos estudos remete a avaliações *in vitro* em populações de células específicas (fibroblastos, astrócitos e macrófagos). Em neurônios e astrócitos, por exemplo, o ferulato de etila em diferentes concentrações (1, 5, 15, 25 e 50  $\mu$ M) apresentou citotoxicidade apenas na maior concentração resultando na redução da viabilidade em 63% e 82% em astrócitos e neurônios respectivamente (SCAPAGNINI et al, 2004). Dados de toxicidade *in vivo* foram encontrados na descrição da substância de uma indústria química (ClearSynth<sup>®</sup>) que a sintetiza, relatando as doses letais médias por via oral para coelhos (3200 mg/kg), ratos (980 mg/kg) e camundongos (300 mg/kg).

Em 2002 foi desenvolvido um método eficiente e prático para a produção do ácido ferúlico e seus derivados, incluindo o ferulato de etila, através do óleo do pó de arroz possibilitando a utilização do mesmo pela indústria (HOSODA et al, 2002). Diante do exposto, o ferulato de etila torna-se uma alternativa viável para ensaio *in vivo* tendo como objeto de estudo modelos de inflamação aguda e crônica a fim de delinear as possíveis aplicações e perspectivas para o desenvolvimento de produtos para o tratamento de afecções inflamatórias, tendo em vista a baixa toxicidade, o perfil farmacocinético e atividades farmacológicas já demonstradas.

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Investigar a atividade anti-inflamatória do ferulato de etila (FE) em modelos experimentais de inflamação e os possíveis mecanismos de ação envolvidos na resposta.

### 2.2. Específicos

- Avaliar o efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos;
- Determinar a ação do FE sobre a migração de leucócitos, concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e nitrito (óxido nítrico) em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina.
- Estudar o efeito do FE sobre o perfil oxidativo (catalase, glutathione, superóxido dismutase, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) no exsudato inflamatório em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina.
- Averiguar o efeito do FE sobre a dor periférica e edema em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina ou adjuvante completo e Freund (ACF).
- Determinar o efeito do FE sobre parâmetros radiográficos em modelos de artrite induzida ACF.
- Examinar alterações no ganho de peso e peso dos órgãos (coração, rins e fígado) em animais tratados cronicamente com FE em modelo experimental de artrite induzida por ACF.
- Avaliar alterações na mucosa gástrica de animais tratados cronicamente com FE em modelo de artrite induzida por ACF.
- Avaliar o efeito do FE sobre coordenação motora e capacidade exploratória em camundongos.

# Material e Métodos

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1. Drogas, reagentes e soluções**

Carragenina (Sigma, EUA), indometacina (Sigma, EUA), Tween 80 (Sigma, USA), solução de Turk, NaCl 0,9%, água destilada, bicarbonato de sódio (MERCK, Brasil), adjuvante completo de Freund (Sigma, USA), ácido acético (Sigma, USA), L-metionina (Sigma, EUA), Triton X-100 (Sigma, EUA), cloreto de hidroxilamina (Sigma, EUA), EDTA, riboflavina (Sigma, EUA), reagente de Griess (Sigma, EUA), ácido tiobarbitúrico (TBA) (Sigma, EUA), dodecilsulfato de sódio (SDS) (Fluka, EUA), diazepam (Sigma, EUA), brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma, EUA), o-dianisidina (Sigma, EUA), fosfato de sódio (Merck, Alemanha), fosfato de potássio (Merck, Alemanha), sulfato de zinco (Merck, Alemanha), peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha), Tris base (Merck, Alemanha), hidróxido de sódio (Merck, Alemanha), ácido tricloroacético (Merck, Alemanha), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Merck, Alemanha), NaNO<sub>2</sub> (Sigma, EUA), kits de ELISA TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Enzo LifeSciences®).

#### **3.2. Ferulato de etila, obtenção e solução**

A obtenção do ferulato de etila (etil-3-hidroxi-4-metoxicinamato) ficou sob a responsabilidade do professor Dr. Damião Pergentino de Sousa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. O ferulato de etila (FE) foi utilizado nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 mg/kg diluído em solução contendo 3% Tween 80 em NaCl 0,9% (0,1 mL/10 g) como veículo.

#### **3.3. Equipamentos**

Pletismômetro (Insight®), Incapacitômetro (Insight®), Balança analítica (Shimadzu®), balança eletrônica (Toledo), câmara de Neubauer (Optik Labor), pipetas automáticas (Eppendorf), agitador tubos vortex (AP56 Phoenix), microscópio ótico, centrífuga, microcentrífuga, banho-maria, paquímetro digital (Digimess®), goniômetro de dedo, capela de fluxo laminar, leitor de placa (BioTek EL800), espectrofotômetro

UV-Vis, câmera fotográfica, câmara de Neubauer, campo aberto (Insight®), rota-rod (Insight®), raio X (Siemens Raex RC 300 D).

### **3.4. Animais**

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, adultos, machos, pesando entre 18-25 e ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar de ambos os sexos, pesando entre 180 e 220 gramas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí – UFPI. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, a temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo de claro e escuro de 12h com ração padrão (Labina – Purina®) e água *ad libitum*. Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas e separados por grupos de 6 animais. Receberam FE, veículo ou indometacina por via oral, e decorridos 60 minutos foram submetidos aos protocolos experimentais. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.), sob orientação da médica veterinária Camila Ernanda Sousa de Carvalho (CRMV-PI 1173) de acordo com a Resolução Nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os protocolos experimentais foram realizados apenas após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais da Universidade Federal do Piauí (CEEA/UFPI, Parecer Nº 082/14).

### **3.5. Ensaio Farmacológicos**

#### **3.5.1. Avaliação da toxicidade**

As doses do FE utilizadas nos protocolos experimentais foram selecionadas com base na dose letal 50 (DL50) via oral já descrita por indústria química (ClearSynth®) que a sintetiza, sendo de 3200 mg/kg para coelhos, 980 mg/kg para ratos e 300 mg/kg para camundongos.

### 3.5.2. Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina

Ratos Wistar foram divididos em seis grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo, FE (12,5, 25, 50 e 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) e, após 1h, receberam a carragenina. O volume das patas foi registrado por pletismômetro (Insight®) em diferentes tempos (1, 2, 3, 4 e 5 h) após a administração intraplantar de carragenina. O edema foi expresso pela diferença, em mililitros (mL), entre o volume final e o volume inicial da pata (WINTER et al., 1962).

### 3.5.3. Efeito do FE sobre a migração celular para bolsa de ar ativada por carragenina

Após tricotomia do dorso, na área interescapular, ratos Wistar foram divididos em cinco grupos de seis animais cada e submetidos ao procedimento para indução da bolsa de ar. No 1º dia, os ratos receberam uma injeção subcutânea na região tricotomizada de 20 mL de ar estéril colhidos em capela de fluxo laminar, para a formação da bolsa de ar. Após isto, os animais retornaram ao biotério, com água e alimento *ad libitum*. No 3º dia, as bolsas foram reinfladas com 10 mL de ar estéril. No 6º dia, os animais foram pré-tratados por via oral com veículo, FE (25, 50 e 100 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg). Após 1 h, 100 µL de Carragenina 1% foi administrado em cada bolsa. Após 4 h, os animais foram eutanasiados e cada bolsa foi lavada com 10 mL de tampão PBS, e o conteúdo foi colhido e transportado para tubos de Falcon. Em seguida, foi realizada uma diluição 1:20 do lavado com líquido de Turk, procedendo-se à contagem total dos leucócitos na câmara de Neubauer. O cálculo do número total de células foi realizado segundo a fórmula abaixo:

$$Células/mL = N \times 20 \times 10^4$$

Onde N representa o número de células contadas na câmara de Neubauer, 10 é fator de diluição da solução de Turk e  $10^4$  é o fator da câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como leucócitos totais/mL (MULLER, 2001).

Alíquota adicional do exsudato foi centrifugada a 4000 G, retirado o sobrenadante e armazenados em *ependorfs* a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da

atividade de mieloperoxidase (MPO), titulações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , titulação de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> como marcador das titulações de óxido nítrico pelo método de Griess, além das avaliações de glutathiona reduzida (GSH), atividade da catalase (Cat), superóxido dismutase (SOD) e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

#### **3.5.4. Efeito do FE sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO)**

O ensaio de MPO foi baseado no método de Bradley et al. (1982), onde 400  $\mu$ L do exsudato da bolsa de ar foram centrifugados a 4000G durante 7 minutos a 4° C. 100  $\mu$ L do sobrenadante foram recolhidos e adicionados a 1 mL de tampão HTAB 0,5% e pH 6,0 (brometo de hexadeciltrimetilamônio) seguida de centrifugação a 4500 g durante 10 minutos a 4°C. Dez microlitros do sobrenadante foram retirados e adicionados a placa de 96 poços com posterior acréscimo de 200  $\mu$ L da solução de leitura (H<sub>2</sub>O destilada, tampão fosfato pH 6,0, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1% e o-dianisidina 0,167 mg/mL). A atividade de MPO foi determinada por medição da alteração da absorbância a 450 nm em leitor de placa durante 5 minutos. A concentração de MPO está expressa em unidades de MPO por microlitro (UMPO/ $\mu$ L) segundo curva padrão obtida para mieloperoxidase.

#### **3.5.5. Avaliação das concentrações de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$**

As quantificações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram realizadas tendo-se como amostra o exsudato da bolsa de ar e utilizando-se kits de ELISA de captura para estas. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Enzo LifeSciences®) e os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , com base na curva padrão obtida. Resumidamente, as amostras em duplicatas foram pipetadas em duas placas de 96 poços previamente preparadas com anticorpos para TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , respectivamente, e deixadas em repouso por duas horas. Após lavagem com tampão de lavagem, o anticorpo específico para cada placa foi adicionado seguido de incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se o conjugado seguido de incubação e lavagem e adição do substrato, o qual foi incubado ao abrigo da luz por 30 minutos, após o que adicionou-se o tampão de parada. A leitura foi então realizada em leitor de placas a 450 nanômetros e o resultado expresso em pg/mL.

### **3.5.6. Concentração do nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) no exsudato de bolsa de ar subcutânea**

Inicialmente, 200  $\mu\text{L}$  do lavado da bolsa de ar foram diluídos em água destilada (1:4 v.v.) para posterior deproteinização pela adição de 1/20 do volume de uma solução de sulfato de zinco na concentração de 300 g/L para atingir uma concentração final de 15 g/L. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1000 g por 15 min a temperatura ambiente (ROMITELLI et al, 2007). Para determinação do óxido nítrico, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi pipetado a um poço da placa de poços seguido da aplicação de 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess e após 10 minutos em temperatura ambiente a densidade óptica (absorbância) foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BioTek EL800), utilizando um filtro de 550 nm (GREEN; WAGNER; GLOGOWSKI et al, 1982). Os resultados estão expressos em termos de  $\mu\text{Mol/mL}$  de acordo com curva-padrão obtida de solução de  $\text{NaNO}_2$  (nitrito de sódio).

### **3.5.7. Concentração de superóxido dismutase (SOD) no lavado de bolsa de ar subcutânea**

Para determinação da atividade da enzima superóxido dismutase foi utilizado o método descrito por Das, Samanta e Chayne (2000) no qual 100  $\mu\text{L}$  da amostra foi adicionado a 1110  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (50 mM, pH 7,4), 75  $\mu\text{L}$  de L-metionina (20 mM), 40  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 (1% v/v), 75  $\mu\text{L}$  de cloreto de hidroxilamina (10 mM) e 100  $\mu\text{L}$  de EDTA (50  $\mu\text{M}$ ) seguido de incubação em banho-maria a 37°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 80  $\mu\text{L}$  de riboflavina (50  $\mu\text{M}$ ) e as amostras foram expostas a luz durante 10 minutos. Ao fim, 100  $\mu\text{L}$  da amostra de ensaio foram adicionados a poços acrescidos de 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess e após 10 minutos, em temperatura ambiente, a densidade óptica (absorbância) foi aferida por espectrofotometria em leitor de ELISA (BioTek EL800), utilizando-se um filtro de 550 nm (GREEN et al, 1982). Uma unidade da atividade da enzima é definida como a quantidade de SOD capaz de inibir em 50 % a formação de nitrito. O cálculo é feito através da fórmula:  $\text{SOD} = v_0/v_1$ ; onde  $v_0$  é a absorbância do controle e  $v_1$  é a absorbância do teste. Neste método, 36 ng de SOD inibem 50% da formação do nitrito.

### **3.5.8. Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no lavado de bolsa de ar subcutânea**

Cem microlitros da amostra foram precipitados pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de TCA 5% (ácido tricloroacético) e agitados em seguida. A mistura foi então centrifugada a 3000 g por 15 minutos a 4°C. Setenta e cinco microlitros do sobrenadante foram adicionados a 150  $\mu\text{L}$  de Tris 0,4M EDTA 0,2M pH 8,9 e 40  $\mu\text{L}$  de ácido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de luz visível a 412 nm. A concentração de glutathiona reduzida é dada por mg/dL (ELLMAN, 1959).

### **3.5.9. Determinação da atividade da catalase no lavado de bolsa de ar subcutânea**

Duzentos microlitros da amostra foram adicionados a 1,2 ml de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e em seguida 1 mL de solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 mM foi adicionado. A absorbância foi aferida em espectrofotômetro UV-Vis a 240 nm e consiste na queda de absorbância devido a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A absorbância foi registrada a cada minuto durante 6 minutos. A catalase é expressa como  $\mu\text{moles}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  decompostos/min/ $\mu\text{L}$  de soro (TAKAHARA et al, 1960).

### **3.5.10. Determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no lavado de bolsa de ar subcutânea**

Duzentos microlitros da amostra foram adicionados a 350  $\mu\text{L}$  de ácido acético a 20% (pH 3,5) e 600  $\mu\text{L}$  de TBA 0,5% (dissolvido em ácido acético). Em seguida as amostras foram submetidas à fervura durante 45 minutos e imediatamente sucedida por banho de gelo durante 15 minutos. Cinquenta microlitros de dodecil sulfato de sódio 8,1% (SDS) foram adicionados e procedeu-se com centrifugação a 12000 g durante 15 minutos a 25°C. A densidade óptica (absorbância) foi medida em espectrofotômetro UV-Vis, utilizando filtros de 420, 490 e 550 nm. O valor foi expresso em nmol/mL (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

### 3.5.11. Avaliação da incapacitação articular

Para avaliação do grau de incapacitação articular motora do membro que recebeu carragenina ou ACF foi utilizado o modelo de incapacitação articular, em ratos, descrito por Tonussi e Ferreira (1992). O sistema é formado por um tambor em aço inoxidável dividido em três baias de 10 cm cada, nas quais os animais são posicionados. Sapatilhas metálicas foram ajustadas em ambas as patas posteriores, sendo que, apenas a sapatilha que esteve na pata posterior direita foi conectada à porta de entrada de dados do computador (**Figura 6**).

**Figura 6** – Incapacitação articular.



Após a colocação das sapatilhas, os animais foram mantidos em suas respectivas caixas, por pelo menos 1h, para adaptação. Para registrar o estado funcional das articulações, os animais foram submetidos à marcha forçada, no cilindro em rotação constante de 3 rpm, por um período de 60 segundos. O computador registra o tempo total que a pata posterior direita dos animais permanece sem tocar a superfície do cilindro neste período (Tempo de Elevação da Pata, TEP, s). Em todos os procedimentos experimentais os animais foram treinados a caminhar no aparelho de registro no dia anterior ao teste. Para validar o experimento, animais normais foram

submetidos à marcha no incapacitômetro (Insight®). Os dados foram apresentados como a média entre os valores do TEP dos animais, obtidos a cada hora após a injeção de carragenina ou ACF e após um, três, cinco, sete, dez e 14 dias após a indução por ACF. Os animais foram eutanasiados no 14º dia para avaliação e coleta de material para análise.

A fim de atestar que um possível efeito positivo no teste de incapacitação articular, ou seja, maior TEP, tenha ocorrido em virtude da ação anti-inflamatória da substância-teste e não em decorrência de ações depressoras sobre o sistema nervoso central foram realizados os testes de rota-rod e campo aberto com o intuito de averiguar alterações na coordenação motora e capacidade exploratória dos animais, respectivamente.

#### **3.5.12. Avaliação do efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por carragenina**

Ratos Wistar, divididos em cinco grupos (n=6 animais) após habituação de 30 minutos e imediatamente antes da indução da incapacitação por carragenina foram submetidos ao teste de incapacitação articular durante 60 segundos a uma velocidade constante de 3 rpm e os resultados foram tomados como medida controle. Após esta medida administrou-se 20 µL de carragenina (300 µg) intra-articular no joelho direito. As medições foram realizadas durante 60 segundos a cada hora até a sexta hora e após 24 horas. Veículo, FE (25, 50 e 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg) foram administrados v.o 1 hora antes da 2ª hora de incapacitação induzida por carragenina. Além da incapacitação, medidas adicionais do volume do joelho e ângulo de extensão do joelho foram tomados como medidas adicionais de inflamação e incapacitação articular, respectivamente.

#### **3.5.13. Avaliação do efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund**

Para indução de artrite por adjuvante completo de Freund, ratos Wistar fêmeas receberam uma dose inicial de 50 µL s.c. de ACF (Sigma, EUA®) contendo 0,5 mg/mL de *Mycobacterium tuberculosis* na base da cauda. Após 21 dias, os animais foram divididos em 6 grupos (n = 6) e tratados por via oral com veículo ou indometacina (5

mg/kg) e três grupos receberam respectivamente FE v.o nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e imediatamente após uma injeção booster semelhante à primeira de ACF na articulação tíbio-femoral direita para indução da artrite (WOODRUFF; STRACHAN; DRYBURGH et al, 2002; GOMES, 2008). O dia da aplicação da segunda dose foi considerado o dia inicial da artrite (D0). Os animais foram avaliados imediatamente antes da aplicação da dose booster, a cada hora durante as cinco primeiras horas e no primeiro (D1) dia (protocolo de fase aguda); terceiro (D3), quinto (D5) e sétimo (D7) dias (protocolo de fase sub-aguda) e no décimo (D10) e décimo quarto dias (D14) (fase crônica). A partir da indução os animais foram tratados diariamente v.o até o 14º dia. Ao fim dos 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados para avaliação e coleta de material para análise. Registros radiográficos foram realizados no D1, D7 e D14 para controle evolutivo.

#### **3.5.14. Avaliação da amplitude articular do joelho após indução de artrite por carragenina e ACF**

A diminuição da amplitude de movimento foi avaliada pelo ângulo de extensão do joelho no qual o animal reagiu durante a extensão forçada da articulação (vocalização ou resistência na pata ao movimento) tendo acoplado à perna posterior direita do animal, na face lateral, um goniômetro de dedo com o braço fixo junto ao fêmur e o braço móvel acompanhando o movimento da tíbia durante a excursão do movimento (**Figura 7**). Os resultados são expressos em °(graus) e representam a diferença entre a medida a cada hora e medida basal tomada previamente à indução da monoartrite (NEUGEBAUER et al, 2007).

**Figura 7** – Goniômetro de dedo.



### **3.5.15. Mensuração do edema de joelho induzido por carragenina e Adjuvante completo de Freund**

Após indução da monoartrite, foi realizada avaliação do edema de joelho através de paquímetro digital (Digimess®) no eixo látero-lateral a nível da interlinha articular do joelho a cada hora, até a quinta hora, e após 24 horas na monoartrite induzida por carragenina e um, dois, três, cinco, sete, dez e catorze dias após indução por ACF.

### **3.5.16. Técnica radiográfica**

Ao fim da avaliação da incapacitação no D1, D7 e D14, os animais foram anestesiados por administração intra-muscular de solução composta por cetamina (50 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg) para realização do registro radiográfico. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com abdução e rotação externa dos eixos femorais tendo suas patas e cauda fixas à mesa para exposição dos joelhos e incidência do feixe de raio X em perfil a uma distância de 120 cm da fonte irradiadora e tempo de exposição de 5 milisegundos na modalidade foco fino (Siemens Raex RC 300 D; 45 Kv; 100 mA) (YU, XIONG, LV et al, 2006) (**Figura 8**). As imagens foram analisadas por radiologista de forma cega observando presença de edema de partes moles, reabsorção da matriz óssea, erosão óssea e classificada de acordo com os sinais clínicos, onde: 0= ausência de lesão óssea; 1= edema de tecido mole; 2= erosão da cartilagem articular; 3=erosão óssea e formação de osteófito. Quanto maior a soma dos fatores mais severa a artrite (CUZZOCREA et al, 2000).

### **3.5.17. Avaliação do ganho de peso, peso dos órgãos e formação de úlceras gástricas em animais com monoartrite induzida por ACF e tratados cronicamente com FE**

Durante o protocolo experimental de artrite induzida por ACF, no qual os animais foram tratados diariamente por 14 dias com veículo (0,9%), FE (25, 50 e 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg), o peso dos animais foi aferido diariamente para ajuste das doses e para controle do ganho de peso expresso pelo peso inicial subtraído do peso final (Ganho de peso = Peso final – Peso inicial). Ao fim do protocolo

os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico seguida de laparotomia exploradora e posterior excisão cirúrgica de coração, rins, fígado e estômago. Os três primeiros foram tomados para pesagem e normalizados para 100 g de peso corporal dos animais a fim de excluir interferência da variação do peso individual segundo equação abaixo:

$$\text{Peso relativo órgão} = \frac{\text{Peso órgão} \times 100}{\text{Peso Animal}}$$

Após excisão do estômago, o mesmo foi seccionado em sua curvatura maior, lavado em solução salina para retirada dos resíduos sólidos e então a porção da mucosa foi exposta e fotografada a uma distância fixa de 20 cm do órgão para posterior análise das lesões gástricas segundo escala proposta por Cryer e Feldman (1999) onde: 0, mucosa com eritema leve ou normal; 1, hemorragia submucosa ou edema sem erosões; 2, uma erosão associada ou não a hemorragia ou edema; 3, de 2 a 4 erosões associadas ou não a hemorragia ou edema; 4, 5 ou mais erosões e/ou uma única úlcera submucosa associada ou não a hemorragia ou edema; e 5, múltiplas úlceras associadas ou não a hemorragia ou edema.

**Figura 8** – Equipamento e posicionamento dos animais para registro radiográfico.



### **3.5.18. Avaliação do efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod**

Por este método é possível detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção e inflamação (LAPA et al., 2003). Camundongos machos foram selecionados 24 h antes do experimento, através de uma triagem em sessões de 1 minuto de duração, sendo escolhidos os que permaneceram todo o tempo de avaliação no aparelho. Os animais foram divididos em quatro grupos (n = 6) e tratados com veículo (v.o), FE (50 e 100 mg/kg, v.o) ou diazepam (4 mg/kg i.p) como controle positivo. Após uma hora de administração do veículo e FE e 30 minutos após administração de diazepam foi registrado o tempo de permanência na barra giratória, podendo o animal ser reconduzido por até três vezes após queda e admitindo-se como tempo máximo 60 segundos.

### **3.5.19. Avaliação do efeito do FE sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto**

Este teste foi utilizado para avaliar a capacidade exploratória dos animais (LAPA, 2003). Os camundongos foram divididos em quatro grupos (n = 6) e tratados com veículo v.o, FE (50 e 100 mg/kg, v.o) ou diazepam (4 mg/kg i.p.). Após 60 minutos para as administrações v.o ou 30 minutos para administração i.p, os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais, paredes transparentes e iluminada com luz vermelha. O animal foi posto na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após esse período, foi avaliado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal, durante um tempo de 5 minutos. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, sendo então realizada a comparação entre os grupos (BROADHURST, 1957).

### **3.5.20. Análise Estatística**

Para análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 6.01. Utilizou-se ANOVA seguida de pós-teste de Tukey para comparação entre grupos com apenas uma variável independente e ANOVA two-way seguida de pós-teste de Bonferroni entre grupos com mais de uma variável independente. Para análise estatística de dados não paramétricos foi realizado o teste de Kruskal Wallis seguido do pós teste de Dunn e os dados foram representados como mediana, valor mínimo e valor máximo. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e o nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ .

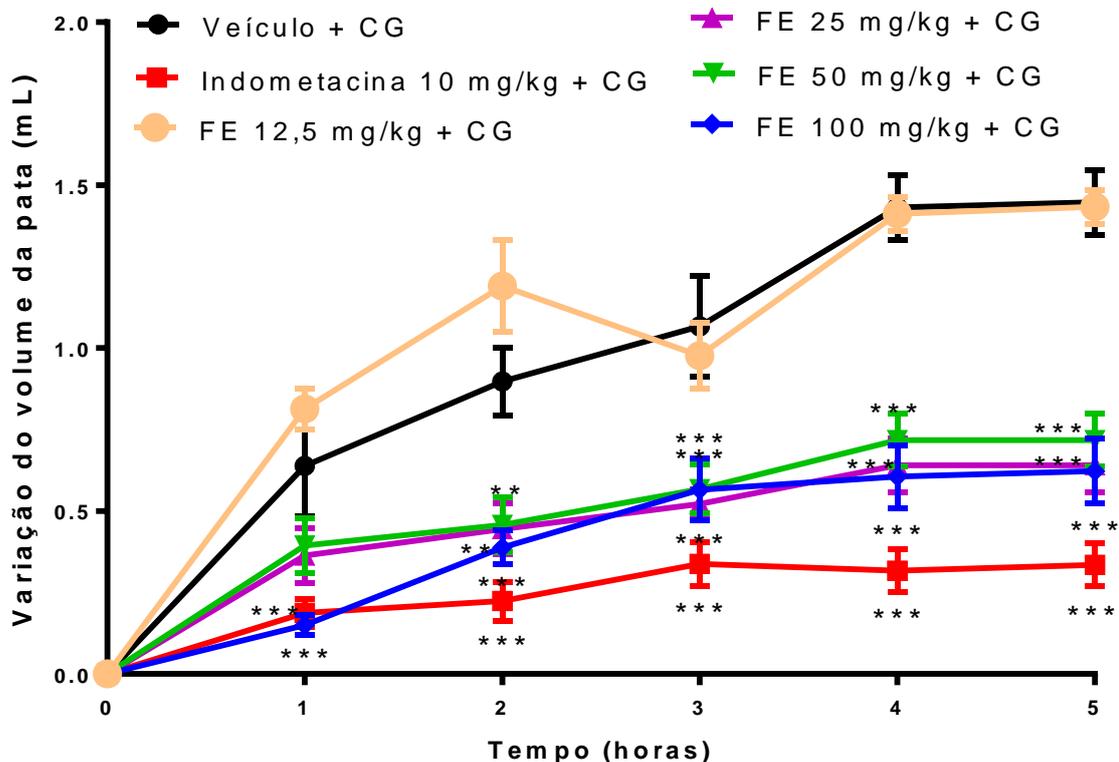
# Resultados

## 4. Resultados

### 4.1. Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina

O pré-tratamento dos animais com FE (FE, 100 mg/kg) inibiu significativamente ( $p < 0,001$ ) o edema de pata induzido por carragenina nas cinco horas de observação quando comparado ao grupo tratado com veículo e que recebeu carragenina na pata (**Figura 9**). Da mesma forma, o pré-tratamento dos animais com FE nas doses de 25 e 50 mg/kg também inibiu significativamente a formação do edema a partir da 2ª hora ( $p < 0,01$ ) e obtendo inibição máxima da 3ª a 5ª horas de observação ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle. De maneira similar ao FE, a indometacina (10 mg/kg), inibiu significativamente a formação do edema já a partir da primeira hora e perdurou até a quinta hora ( $p < 0,001$ ) comparativamente ao grupo controle. O FE na dose de 12,5 mg/kg não apresentou inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 1**).

**Figura 9** - Efeito do FE sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).



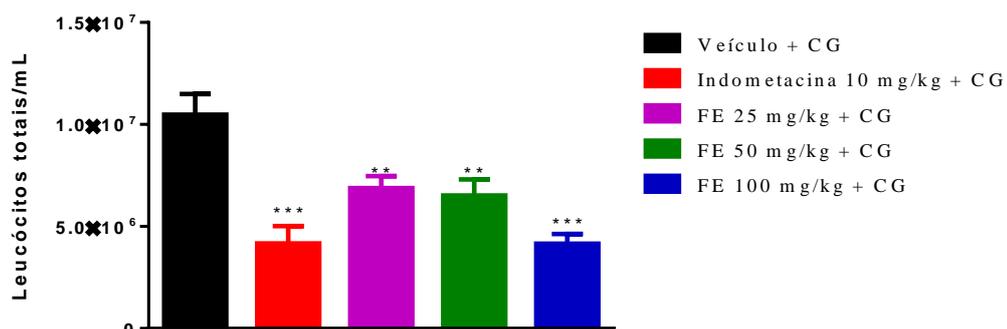
**Tabela 1:** Efeito do FE (sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %; 0,1 mL, i.pl.) em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Tratamento (mg/kg, v.o)	Edema de pata (mL)				
	Intervalo de tempo				
	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Veículo	0,63 $\pm$ 0,15	0,89 $\pm$ 0,11	1,07 $\pm$ 0,15	1,43 $\pm$ 0,10	1,45 $\pm$ 0,10
Indometacina	0,19 $\pm$ 0,04***	0,22 $\pm$ 0,06***	0,34 $\pm$ 0,07***	0,32 $\pm$ 0,07***	0,34 $\pm$ 0,06***
FE 12,5 mg/kg	0,81 $\pm$ 0,06	1,90 $\pm$ 0,14	0,98 $\pm$ 0,10	1,41 $\pm$ 0,05	1,43 $\pm$ 0,05
FE 25 mg/kg	0,36 $\pm$ 0,08	0,44 $\pm$ 0,07**	0,52 $\pm$ 0,04***	0,64 $\pm$ 0,08***	0,66 $\pm$ 0,07***
FE 50 mg/kg	0,39 $\pm$ 0,08	0,46 $\pm$ 0,09**	0,57 $\pm$ 0,07***	0,72 $\pm$ 0,08***	0,71 $\pm$ 0,09***
FE 100 mg/kg	0,15 $\pm$ 0,03***	0,38 $\pm$ 0,05***	0,56 $\pm$ 0,09***	0,60 $\pm$ 0,10***	0,62 $\pm$ 0,10***

#### 4.2. Efeito do FE sobre a migração celular em bolsa de ar ativada por carragenina

A administração de carragenina na bolsa de ar resultou em aumento no número de leucócitos totais no grupo veículo ( $1,048 \cdot 10^7 \pm 1,013 \cdot 10^6$ ) quando comparado aos demais grupos pré-tratados com FE nas doses de 25 mg/kg ( $6,88 \cdot 10^6 \pm 5,8 \cdot 10^4$ ,  $p < 0,01$ ), 50 mg/kg ( $6,52 \cdot 10^6 \pm 7,2 \cdot 10^4$ ,  $p < 0,01$ ) e 100 mg/kg ( $4,16 \cdot 10^6 \pm 4,7 \cdot 10^4$ , com  $p < 0,001$ ). Os animais pré-tratados com indometacina (10 mg/kg) também apresentaram redução significativa na contagem total de leucócitos ( $4,167 \cdot 10^6 \pm 4,7 \cdot 10^4$ ,  $p < 0,001$ ) (**Figura 10**).

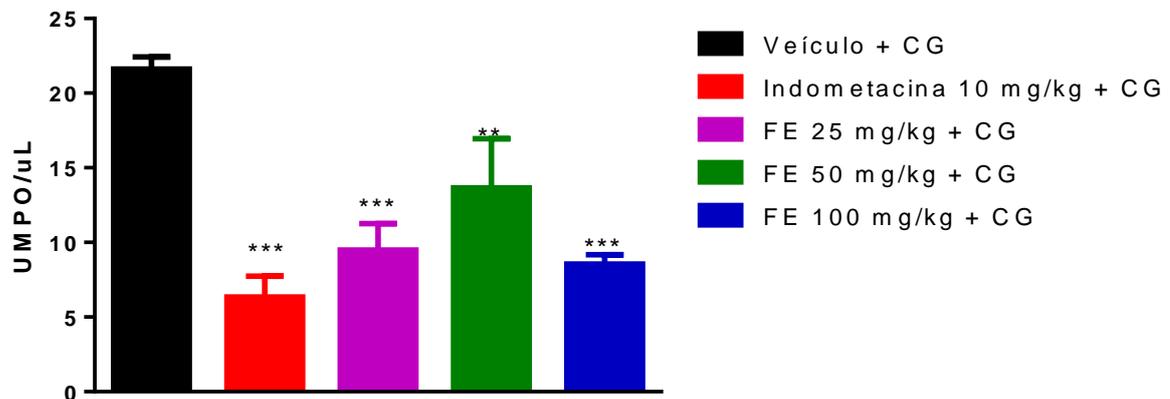
**Figura 10** - Efeito do FE sobre o número total de leucócitos em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.3. Efeito do FE sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos

A atividade da mieloperoxidase apresentou-se diminuída nos animais tratados previamente com FE nas doses de 25 mg/kg ( $9,491 \pm 1,77$ ,  $p < 0,001$ ), 50 mg/Kg ( $13,66 \pm 3,30$ ,  $p < 0,01$ ) ou 100 mg/kg ( $8,56 \pm 0,61$ ,  $p < 0,001$ ) em relação ao grupo veículo ( $21,62 \pm 0,81$ ). O mesmo foi observado nos animais tratados com o anti-inflamatório padrão indometacina ( $6,34 \pm 1,39$ ,  $p < 0,001$ ) (**Figura 11**).

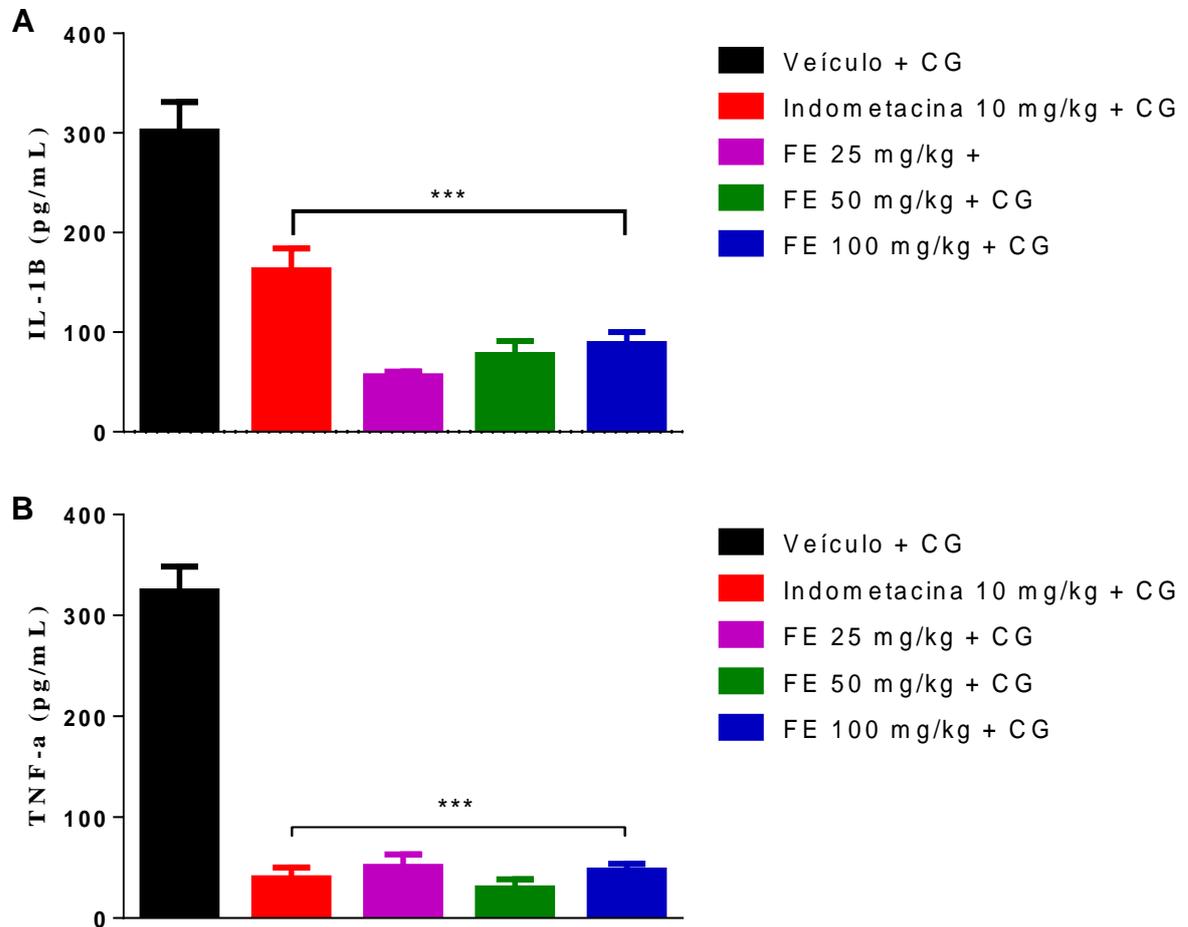
**Figura 11** - Efeito do FE sobre a atividade da mieloperoxidase em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.4. Efeito do FE sobre as concentrações de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos

Quanto aos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , os animais tratados com FE apresentaram concentrações significativamente menores ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo veículo ( $323,8 \pm 24,84$  e  $301,4 \pm 29,74$ , respectivamente) em todas as doses administradas (TNF- $\alpha$  - 25 mg/kg:  $50,71 \pm 12,40$ ; 50 mg/kg:  $29,55 \pm 8,90$ ; e 100 mg/kg:  $47,31 \pm 6,47$ / IL-1 $\beta$  - 25 mg/kg:  $55,70 \pm 4,83$ ; 50 mg/kg:  $77,03 \pm 13,99$ ; e 100 mg/kg:  $88,14 \pm 12,05$ ) com resultados semelhantes aos encontrados para o tratamento prévio com o anti-inflamatório padrão (TNF- $\alpha$   $39,69 \pm 10,48$  e IL-1 $\beta$   $162,2 \pm 22,04$ ) (**Figura 12**).

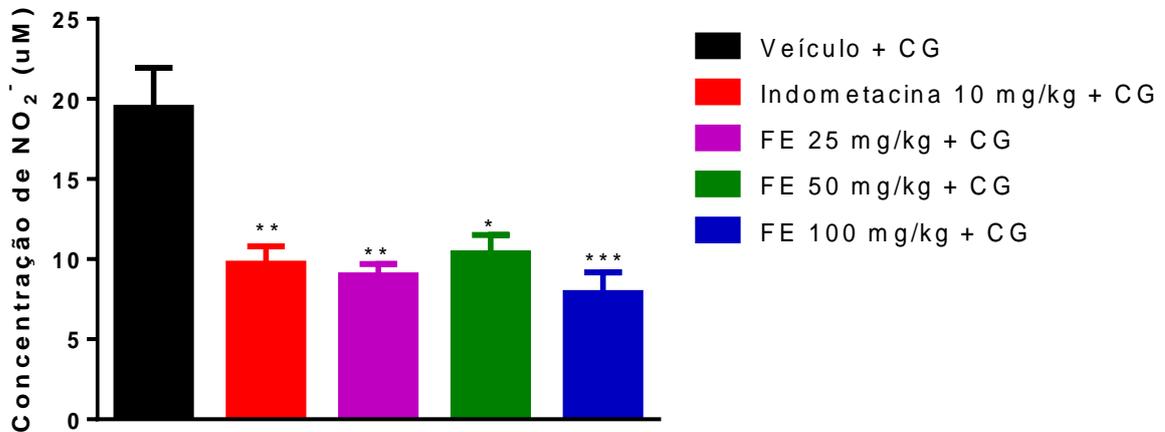
**Figura 12-** Efeito do FE nos níveis de IL-1 $\beta$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) em bolsa de ar induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p$ <0,001 vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.5. Efeito do FE sobre a concentração de nitrito (NO $_2^-$ ) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos

O pré-tratamento dos animais com FE nas doses de 25 ( $8,98 \pm 0,71$ ,  $p < 0,01$ ), 50 ( $10,37 \pm 1,45$ ,  $p < 0,05$ ) e 100 mg/kg ( $7,88 \pm 1,29$ ,  $p < 0,001$ ) bem como os animais tratados com indometacina 10 mg/kg ( $9,72 \pm 1,08$ ,  $p < 0,01$ ) resultaram em diminuição significativa da concentração de NO $_2^-$  (nitrito) se comparado ao grupo veículo ( $19,45 \pm 2,50$ ). Embora os grupos tratados tenham apresentado redução na concentração do NO $_2^-$  em diferentes intensidades, não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com FE e indometacina ( $p > 0,05$ ) (**Figura 13**).

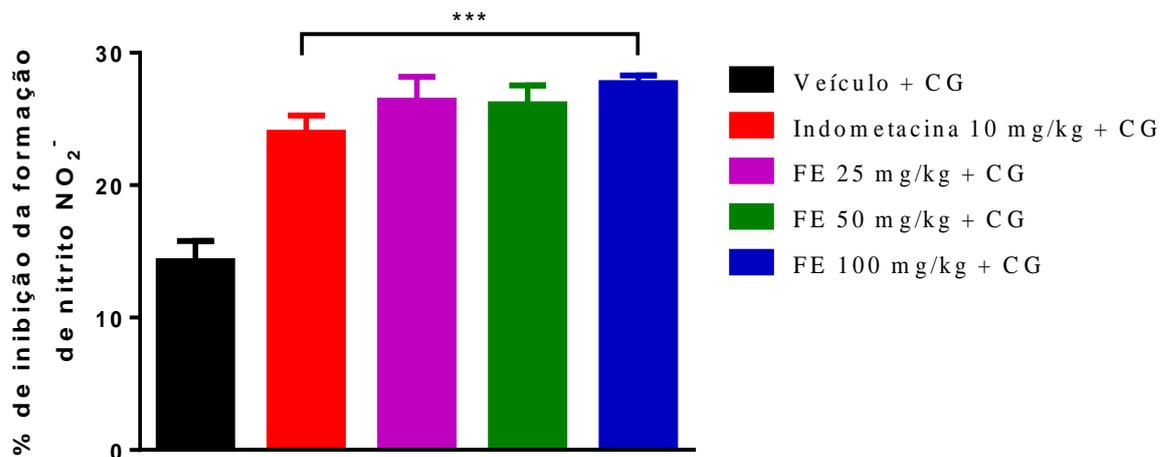
**Figura 13** – Efeito do FE sobre a concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.6. Efeito do FE sobre a atividade da SOD em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos

Quanto à atividade da enzima superóxido dismutase, observou-se que tanto os grupos pré-tratados com FE nas diferentes doses (25 mg/kg:  $26,39 \pm 1,79$ ; 50 mg/kg:  $26,12 \pm 1,41$ ; 100 mg/kg:  $27,72 \pm 0,56$ ) quanto os grupos tratados com indometacina ( $23,97 \pm 1,29$ ) foram igualmente efetivos no aumento da indução da superóxido dismutase comparados ao grupo veículo ( $14,27 \pm 1,51$ ) ( $p < 0,001$ ) (**Figura 14**).

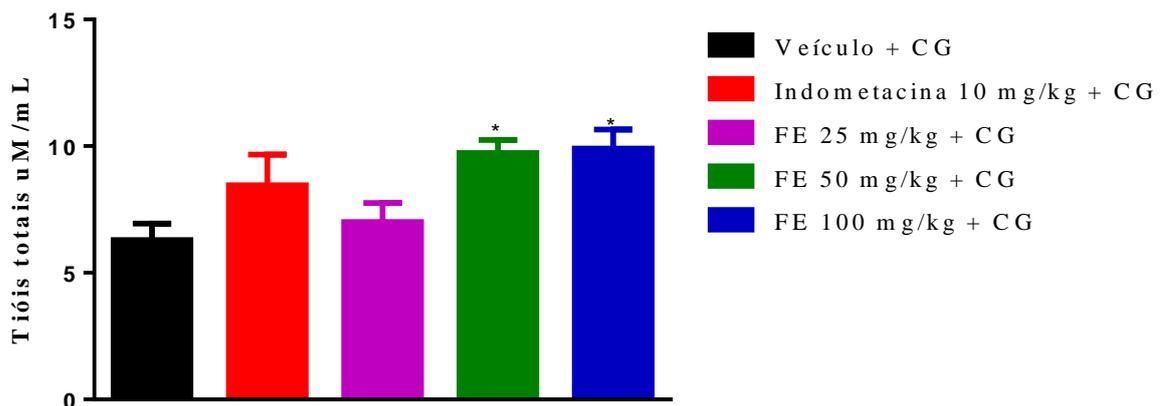
**Figura 14** – Efeito do FE sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) expressa indiretamente através do percentual de inibição da formação de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.7. Efeito do FE sobre a concentração da Glutathiona reduzida em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina em ratos

A administração prévia de FE, v.o, nas doses de 50 mg/kg ( $9,28 \pm 0,51$ ) e 100 mg/kg ( $9,91 \pm 0,75$ ) aumentaram significativamente a concentração de tióis totais no exsudato de bolsa de ar em ratos em relação ao grupo veículo ( $6,30 \pm 0,63$ ). O tratamento dos animais com FE na dose de 25 mg/kg ( $7,01 \pm 0,75$ ) e indometacina 10 mg/kg ( $8,46 \pm 1,22$ ) não resultaram em diferença significativa em relação ao grupo veículo ( $p > 0,05$ ) (**Figura 15**).

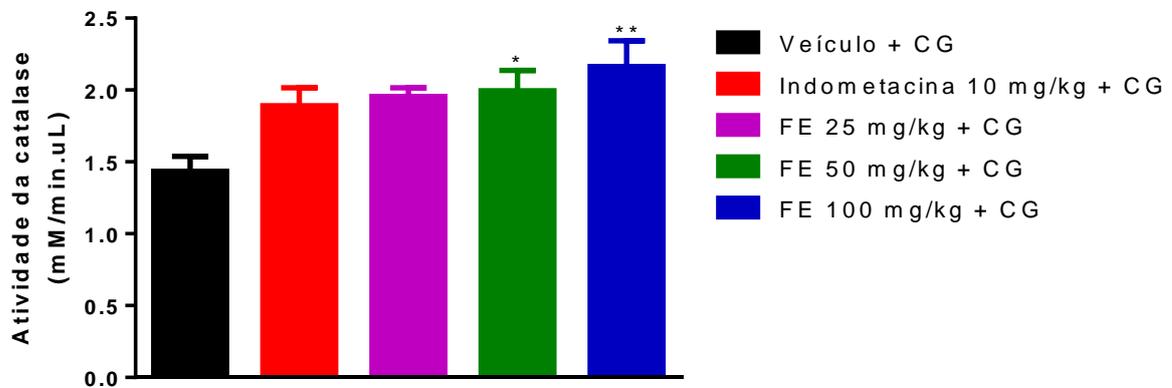
**Figura 15** – Efeito do FE sobre a concentração de glutathiona reduzida expressa em termos de tióis totais em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.8. Efeito do FE sobre a atividade da enzima catalase em modelo de bolsa de ar induzida por carragenina em ratos

A atividade da catalase apresentou-se significativamente aumentada nos grupos tratados com FE nas doses de 50 mg/kg ( $1,99 \pm 0,14$ ,  $p < 0,05$ ) e 100 mg/kg ( $2,16 \pm 0,18$ ,  $p < 0,01$ ) comparativamente ao grupo veículo ( $1,44 \pm 0,10$ ). O tratamento dos animais com FE 25 mg/kg ( $1,95 \pm 0,06$ ) e indometacina ( $1,89 \pm 0,12$ ) não resultou em aumento significativo da atividade da enzima em relação ao grupo veículo ( $p > 0,05$ ) (**Figura 16**).

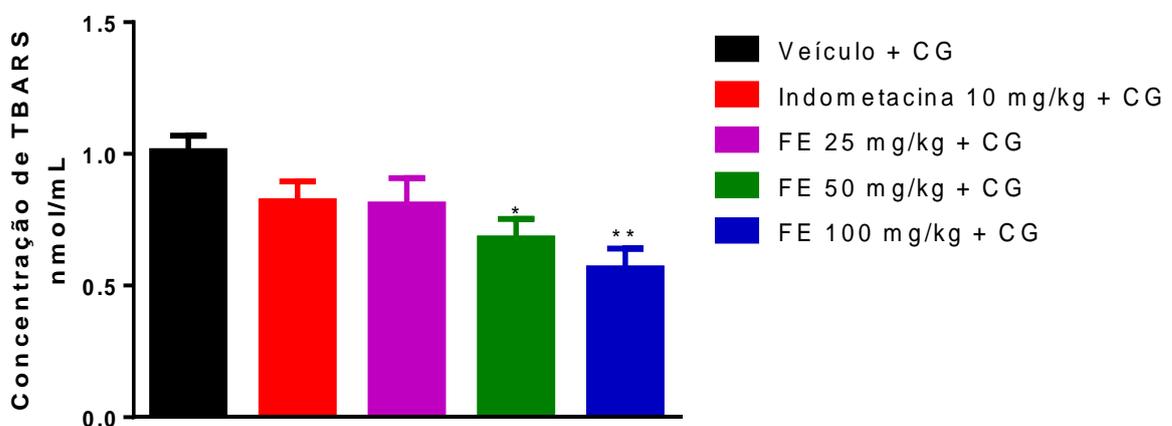
**Figura 16** – Efeito do FE sobre a atividade da catalase em bolsa de ar ativada por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.9. Efeito do FE sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em modelo de bolsa de ar ativada por carragenina em ratos

O FE nas doses de 50 mg/kg ( $0,68 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ) e 100 mg/Kg ( $0,56 \pm 0,08$ ,  $p < 0,01$ ) foi efetivo na redução das concentrações de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico comparativamente ao grupo veículo ( $1,01 \pm 0,06$ ). A indometacina ( $0,82 \pm 0,08$ ) e o FE 25 mg/kg ( $0,81 \pm 0,10$ ), porém, não obtiveram os mesmos resultados ( $p > 0,05$ ) (Figura 17).

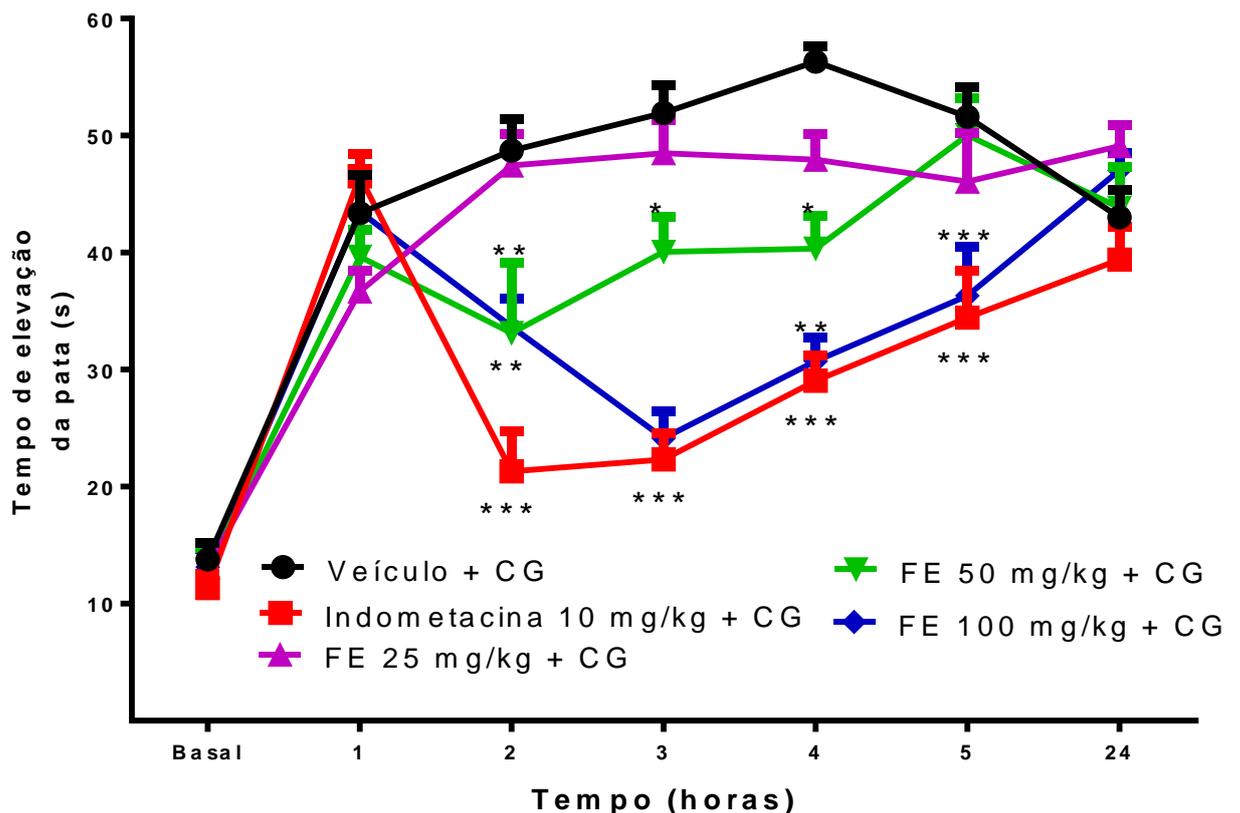
**Figura 17** – Efeito do FE sobre a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em bolsa de ar induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.10. Efeito do FE sobre a incapacitação articular induzida por carragenina

O tratamento prévio dos animais com FE nas doses de 50 mg/kg diminuiu significativamente a incapacitação articular induzida por carragenina da 2<sup>a</sup> a 4<sup>a</sup> em relação ao grupo veículo (**Tabela 2**). O FE 100 mg/kg, de forma semelhante à indometacina, reduziu significativamente a incapacitação até a quinta hora ( $36,32 \pm 4,16$ ,  $p < 0,001$ ). FE (25 mg/kg) não apresentou efeito sobre a incapacitação articular induzida por carragenina em ratos ( $p > 0,05$ ) (**Figura 18**).

**Figura 18** – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



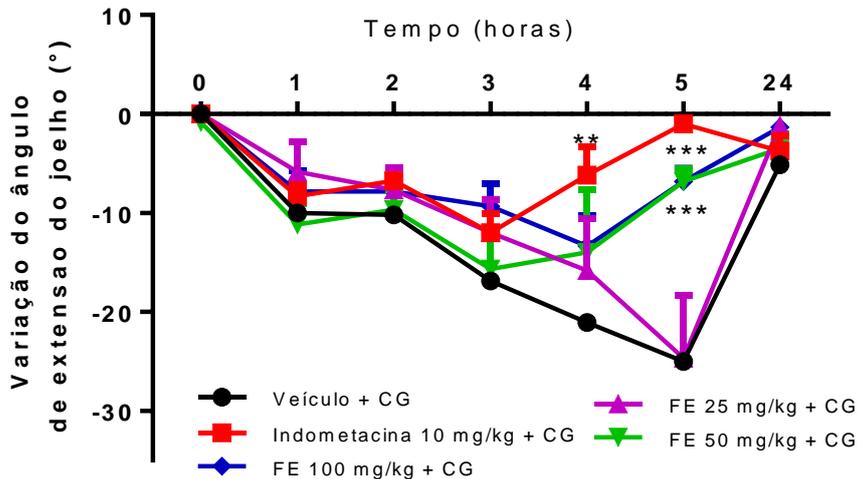
**Tabela 2** – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Intervalo de tempo	Grupos				
	Tempo de elevação da pata (s)				
	Veículo	Indometacina	FE 25 mg/kg	FE 50 mg/kg	FE 100 mg/kg
<b>Basal</b>	13,77 $\pm$ 1,41	11,33 $\pm$ 1,21	13,09 $\pm$ 0,86	12,91 $\pm$ 1,88	13,14 $\pm$ 1,55
<b>1 hora</b>	43,36 $\pm$ 3,29	46,51 $\pm$ 1,93	36,69 $\pm$ 1,80	39,65 $\pm$ 2,32	43,52 $\pm$ 2,96
<b>2 horas</b>	48,71 $\pm$ 2,68	21,31 $\pm$ 3,83***	47,46 $\pm$ 2,64	33,14 $\pm$ 5,97**	33,68 $\pm$ 2,36**
<b>3 horas</b>	51,95 $\pm$ 2,33	22,33 $\pm$ 2,19***	48,50 $\pm$ 2,86	40,08 $\pm$ 2,97*	24,14 $\pm$ 2,29***
<b>4 horas</b>	56,32 $\pm$ 1,33	29,04 $\pm$ 2,21***	47,95 $\pm$ 2,14	40,35 $\pm$ 2,81*	30,71 $\pm$ 2,01**
<b>5 horas</b>	51,62 $\pm$ 2,52	34,45 $\pm$ 3,99***	46,06 $\pm$ 4,12	50,04 $\pm$ 3,19	36,32 $\pm$ 4,15***
<b>24 horas</b>	43,01 $\pm$ 2,38	39,41 $\pm$ 2,79	49,10 $\pm$ 1,79	43,85 $\pm$ 3,49	47,03 $\pm$ 1,50

#### 4.11. Efeito do FE sobre a amplitude articular em modelo de monoartrite induzida por carragenina

O FE (50 e 100 mg/kg) inibiu significativamente a diminuição da amplitude articular para extensão do joelho em relação ao grupo veículo na quinta hora após indução da monoartrite por carragenina ( $p < 0,001$ ) (**Figura 19**).

**Figura 19** - Efeito do FE sobre a variação do ângulo do joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



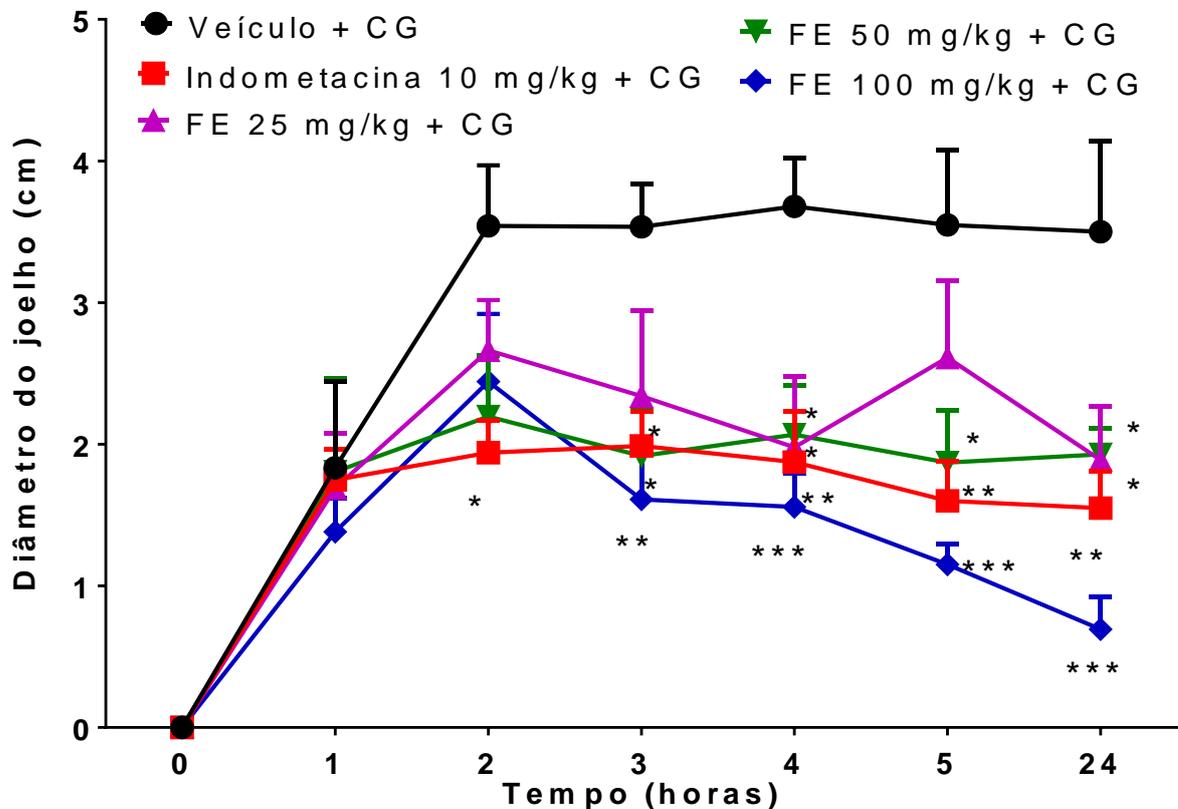
#### 4.12. Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina

O FE foi efetivo na redução do edema em todas as doses testadas a partir da 3ª hora até vinte e quatro horas após a indução da monoartrite induzida por carragenina (**Figura 20 e Tabela 3**).

**Tabela 3** – Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Intervalo de tempo	Diâmetro do joelho (cm)				
	Veículo	Indometacina	FE 25 mg/kg	FE 50 mg/kg	FE 100 mg/kg
1 hora	1,83 $\pm$ 0,61	1,75 $\pm$ 0,21	1,69 $\pm$ 0,39	1,81 $\pm$ 0,66	1,38 $\pm$ 0,24
2 horas	3,54 $\pm$ 0,43	1,94 $\pm$ 0,23*	2,67 $\pm$ 0,36	2,19 $\pm$ 0,43	2,44 $\pm$ 0,47
3 horas	3,54 $\pm$ 0,30	1,99 $\pm$ 0,25*	2,33 $\pm$ 0,61	1,92 $\pm$ 0,32*	1,61 $\pm$ 0,33**
4 horas	3,67 $\pm$ 0,34	1,87 $\pm$ 0,36*	1,98 $\pm$ 0,50*	2,07 $\pm$ 0,35*	1,56 $\pm$ 0,24***
5 horas	3,54 $\pm$ 0,53	1,60 $\pm$ 0,28**	2,61 $\pm$ 0,54	1,87 $\pm$ 0,37*	1,15 $\pm$ 0,14***
24 horas	3,50 $\pm$ 0,64	1,54 $\pm$ 0,26**	1,89 $\pm$ 0,38*	1,82 $\pm$ 0,18*	0,69 $\pm$ 0,23***

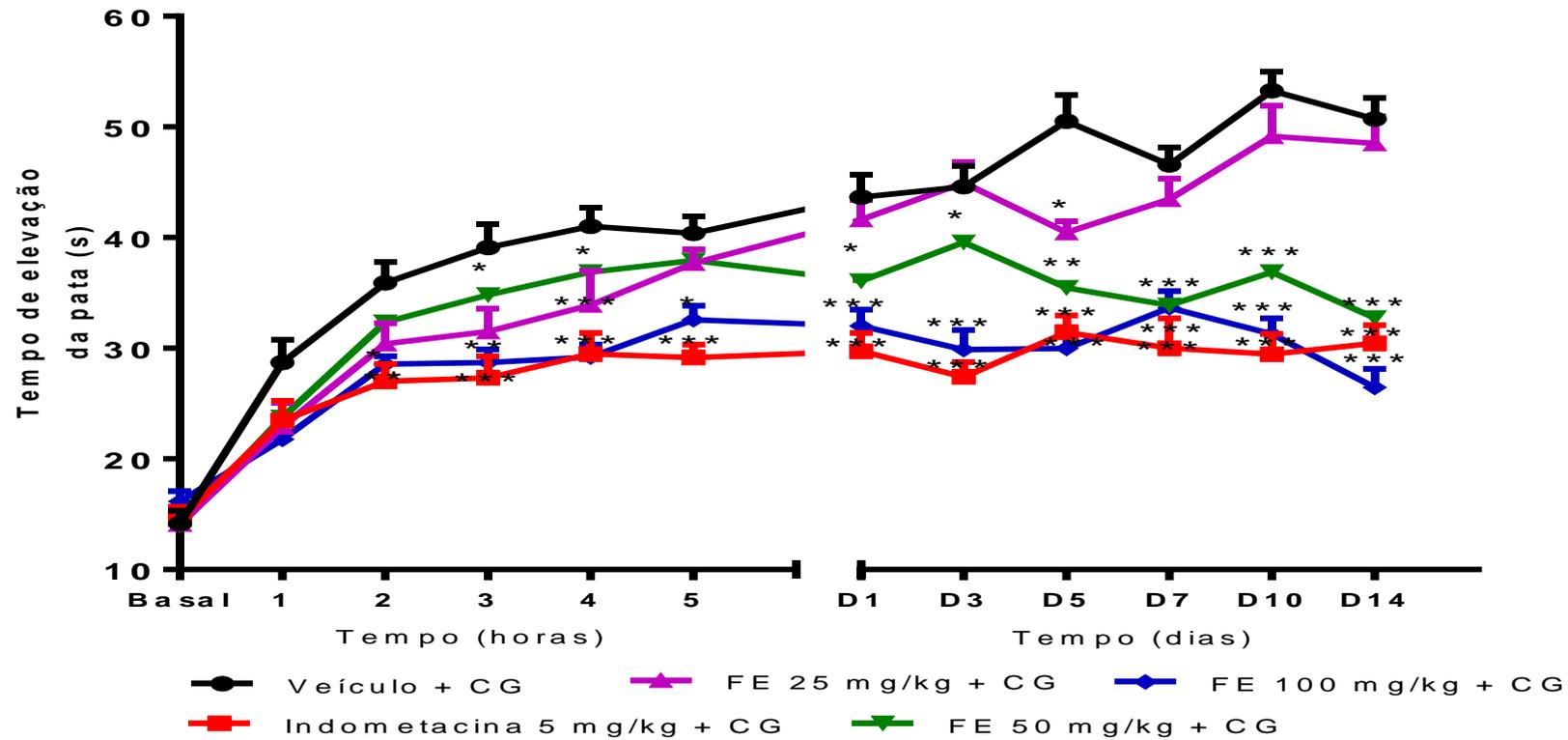
**Figura 20** – Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



#### 4.13. Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund (ACF)

A administração intra-articular de ACF resultou em aumento do tempo de elevação da pata nos animais tratados com veículo em relação ao tempo de elevação da pata (TEP) basal da primeira hora após administração de ACF até o 14º dia de avaliação ( $p < 0,001$ ). O tratamento dos animais com indometacina e FE 100 mg/kg diminuiu significativamente o TEP em todos os pontos de observação a partir da 2ª hora comparativamente aos animais tratados com veículo (**Tabela 4**). O tratamento diário com FE na dose de 50 mg/Kg resultou em diminuição do TEP apenas a partir da quarta hora de avaliação até o 14º dia em relação ao grupo tratado com veículo. O tratamento com FE 25 mg/Kg reduziu o TEP apenas na 3ª e 4ª horas e no quinto dia de tratamento ( $40,45 \pm 1,00$ ,  $p < 0,05$ ) (**Figura 21**).

**Figura 21** – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por ACF. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



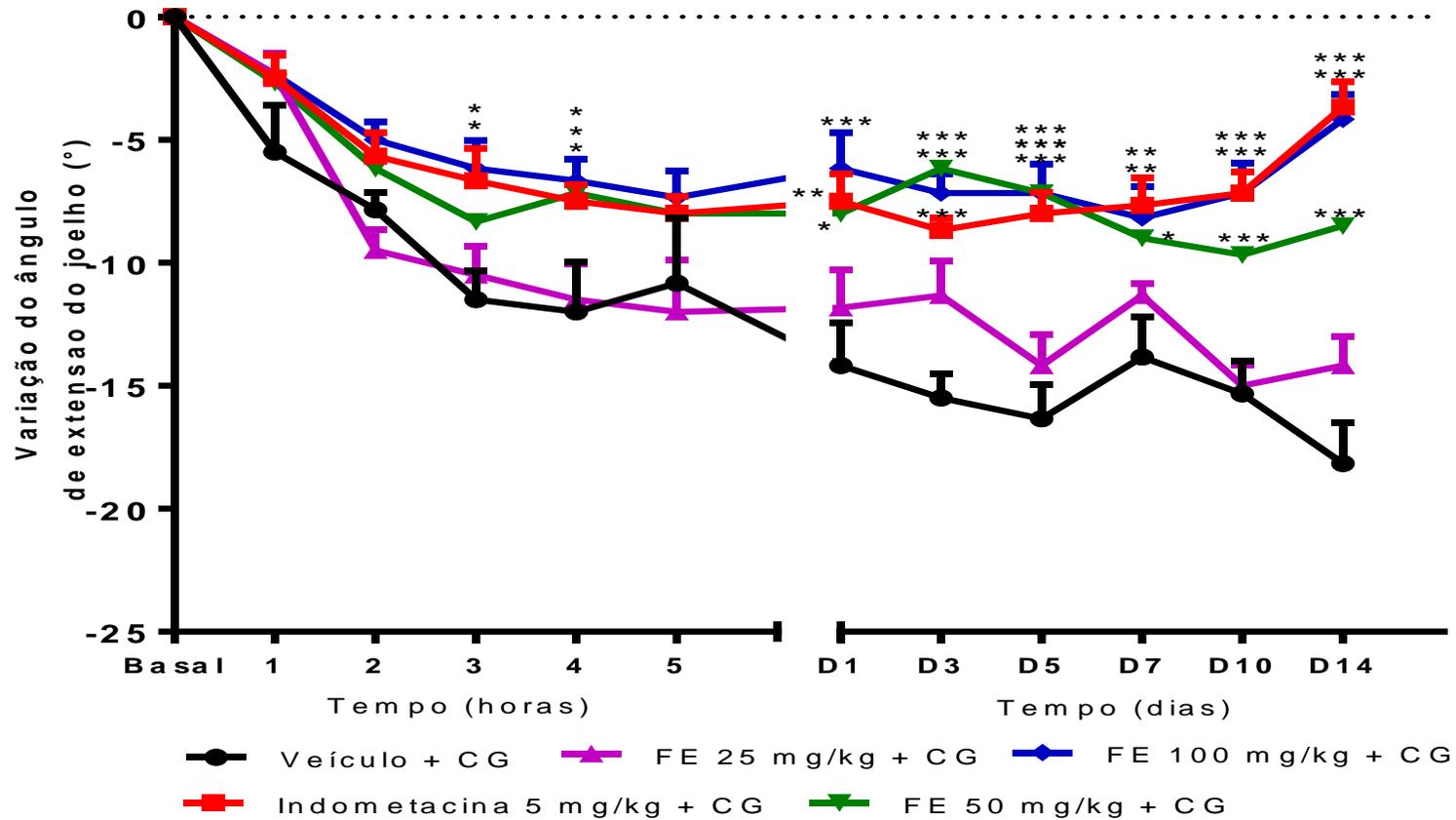
**Tabela 4** – Efeito do FE sobre o tempo de elevação da pata em modelo de incapacitação articular induzida por ACF. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Intervalo de tempo	Grupos				
	Veículo	Indometacina 5 mg/kg	FE 25 mg/kg	FE 50 mg/kg	FE 100 mg/kg
Basal	14,15 $\pm$ 1,14	14,55 $\pm$ 1,12	14,13 $\pm$ 1,31	14,01 $\pm$ 1,28	16,16 $\pm$ 0,95
1 hora	28,72 $\pm$ 2,06	23,46 $\pm$ 1,80	22,91 $\pm$ 2,18	23,74 $\pm$ 1,44	21,76 $\pm$ 1,45
2 horas	35,94 $\pm$ 1,88	27,01 $\pm$ 1,57**	30,41 $\pm$ 1,83	32,33 $\pm$ 2,98	28,57 $\pm$ 0,71*
3 horas	39,09 $\pm$ 2,09	27,31 $\pm$ 2,01***	31,52 $\pm$ 2,00*	34,82 $\pm$ 1,49	28,71 $\pm$ 1,16***
4 horas	41,01 $\pm$ 1,74	29,48 $\pm$ 2,06***	33,91 $\pm$ 3,04	36,87 $\pm$ 1,36	29,21 $\pm$ 1,08***
5 horas	40,37 $\pm$ 1,53	29,14 $\pm$ 1,20***	37,68 $\pm$ 1,21	37,93 $\pm$ 2,83	32,56 $\pm$ 1,30*
Dia 1	43,67 $\pm$ 2,00	29,73 $\pm$ 1,60***	41,62 $\pm$ 1,79	36,06 $\pm$ 2,21*	32,00 $\pm$ 1,46***
Dia 3	44,60 $\pm$ 1,88	27,39 $\pm$ 1,33***	44,95 $\pm$ 1,90	39,56 $\pm$ 1,64	29,87 $\pm$ 1,74***
Dia 5	50,51 $\pm$ 2,38	31,44 $\pm$ 1,53***	40,45 $\pm$ 1,04*	35,47 $\pm$ 1,91**	29,97 $\pm$ 1,64***
Dia 7	46,57 $\pm$ 1,57	30,02 $\pm$ 2,66***	43,47 $\pm$ 1,91	33,86 $\pm$ 1,54***	33,65 $\pm$ 1,47***
Dia 10	53,25 $\pm$ 1,56	29,45 $\pm$ 1,80***	49,15 $\pm$ 2,77	36,87 $\pm$ 1,10***	31,29 $\pm$ 1,43***
Dia 14	50,72 $\pm$ 1,88	30,45 $\pm$ 1,64***	48,50 $\pm$ 2,46	32,74 $\pm$ 1,03***	26,46 $\pm$ 1,74***

#### 4.14. Efeito do FE sobre a amplitude articular em modelo de monoartrite induzida por ACF

O FE (50 e 100 mg/kg) inibiu significativamente a diminuição da amplitude articular para extensão do joelho em relação ao grupo veículo na quarta hora após indução da monoartrite por ACF e em todos os dias a partir de D1 ( $p < 0,001$ ) (**Figura 22**). O resultado encontrado para o FE nas doses efetivas não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com o anti-inflamatório padrão indometacina.

**Figura 22** - Efeito do FE sobre a variação do ângulo do joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



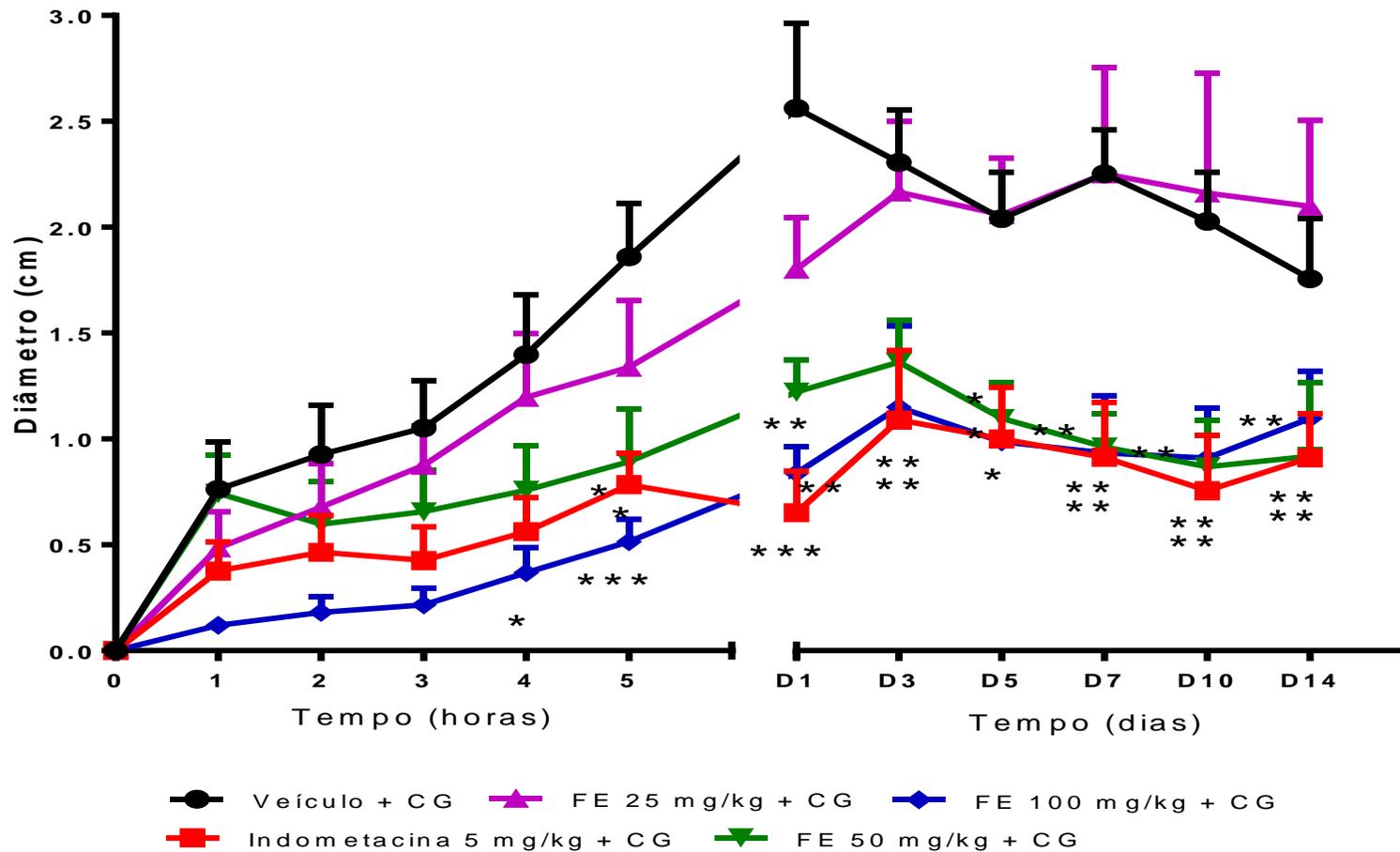
#### 4.15. Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por Adjuvante Completo de Freund

O pré-tratamento dos animais com FE na dose de 100 mg/kg resultou em redução significativa do edema de joelho em todos os tempos de observação a partir da 4ª hora (**Tabela 5**). De maneira similar, o tratamento dos animais com FE 50 mg/kg resultou em redução significativa do edema em todas as horas, à exceção do segundo dia, a partir da 5ª hora até D14. O FE 25 mg/Kg não resultou em diminuição do edema. O grupo tratado com indometacina apresentou redução significativa do edema a partir da 5ª hora de observação e perdurou até o 14º dia de observação (**Figura 22**).

**Tabela 5**– Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).

Intervalo de tempo	Grupos				
	Veículo	Indometacina 5 mg/kg	FE 25 mg/kg	FE 50 mg/kg	FE 100 mg/kg
1 hora	0,76 $\pm$ 0,23	0,38 $\pm$ 0,13	0,48 $\pm$ 0,17	0,74 $\pm$ 0,18	0,12 $\pm$ 0,04
2 horas	0,93 $\pm$ 0,23	0,47 $\pm$ 0,18**	0,68 $\pm$ 0,20	0,60 $\pm$ 0,20	0,18 $\pm$ 0,07*
3 horas	1,05 $\pm$ 0,22	0,43 $\pm$ 0,16***	0,88 $\pm$ 1,19*	0,65 $\pm$ 0,19	0,21 $\pm$ 0,80***
4 horas	1,40 $\pm$ 0,28	0,56 $\pm$ 0,16***	1,20 $\pm$ 0,30	0,75 $\pm$ 0,21	0,37 $\pm$ 0,12***
5 horas	1,86 $\pm$ 0,25	0,78 $\pm$ 0,15***	1,34 $\pm$ 0,32	0,89 $\pm$ 0,25	0,52 $\pm$ 0,11*
Dia 1	2,54 $\pm$ 0,40	0,65 $\pm$ 0,20***	1,80 $\pm$ 0,24	1,22 $\pm$ 0,15*	0,84 $\pm$ 0,13***
Dia 3	2,30 $\pm$ 0,25	1,09 $\pm$ 0,32***	2,15 $\pm$ 0,33	1,36 $\pm$ 0,12	1,15 $\pm$ 0,38***
Dia 5	2,04 $\pm$ 0,21	1,00 $\pm$ 0,24***	2,05 $\pm$ 0,26***	1,09 $\pm$ 0,17***	0,99 $\pm$ 0,28***
Dia 7	2,25 $\pm$ 0,21	0,91 $\pm$ 0,25***	2,25 $\pm$ 0,50	0,96 $\pm$ 0,16***	0,93 $\pm$ 0,27***
Dia 10	2,03 $\pm$ 0,23	0,76 $\pm$ 0,26***	2,16 $\pm$ 0,56	0,87 $\pm$ 0,22***	0,91 $\pm$ 0,24***
Dia 14	1,75 $\pm$ 0,28	0,91 $\pm$ 0,20***	2,09 $\pm$ 0,40	0,92 $\pm$ 0,35***	1,09 $\pm$ 0,22***

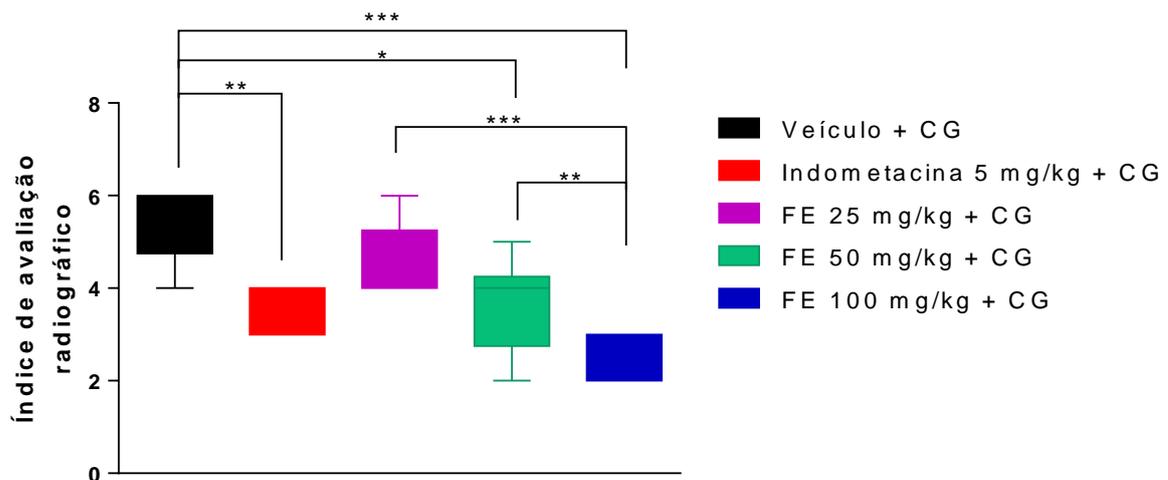
**Figura 23**– Efeito do FE sobre o edema de joelho em modelo de incapacitação articular induzida por ACF. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA two way e pós-teste de Bonferroni).



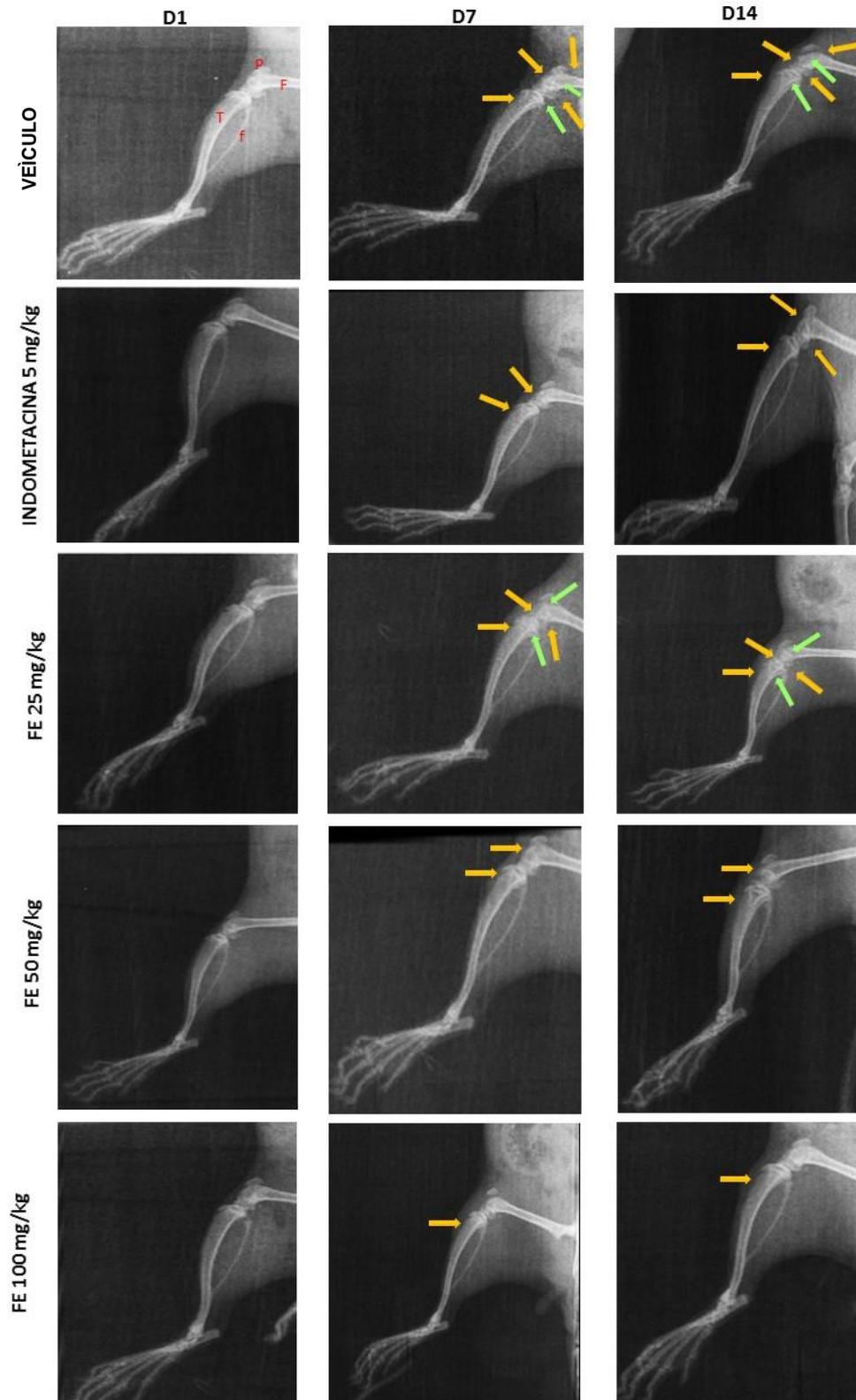
#### 4.16. Efeito do FE sobre alterações radiográficas em joelhos de ratos com monoartrite induzida por adjuvante completo de Freund (ACF)

Com base nas radiografias apresentadas observa-se que o FE 100 mg/kg, 50 mg/kg e 25 mg/kg e a indometacina 5 mg/Kg exerceram diferentes graus de proteção sobre a articulação tíbio-femural de ratos com monoartrite induzida por ACF. Dessa forma, o FE 100 mg/kg apresentou pequena erosão óssea ao final de 14 dias de experimento, bem como os animais tratados com FE 50 mg/kg e indometacina 5 mg/kg. Os animais tratados com FE 25 mg/kg apresentaram vários focos de lesão óssea e artrose assemelhando-se aos animais tratados apenas com veículo (**Figuras 24 e 25**).

**Figura 24** – Efeito do FE sobre alterações radiográficas em ratos com monoartrite de joelho induzida por ACF. Os valores estão expressos como mediana, valor máximo e valor mínimo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (Kruskal Wallis e pós teste de Dunn).



**Figura 25** – Efeito do FE sobre alterações radiográficas de joelho de ratos com monoartrite induzida por ACF no dia da indução (D1) e após sete (D7) e 14 dias (D14) de tratamento. **Legenda:** F- fêmur, f- fíbula, T- tíbia, P – patela;  áreas de erosão óssea;  áreas de artrose/desgaste articular.



#### 4.17. Ganho de peso e peso dos órgãos em animais com monoartrite induzida por ACF tratados diariamente com FE

O tratamento crônico dos animais com indometacina (5 mg/kg) resultou em diminuição significativa do ganho de peso se comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ) bem como aumento significativo do peso relativo de fígado e rins ( $p < 0,05$ ). O tratamento crônico com FE nas diferentes doses não resultou em alterações de ganho de peso e no peso relativo dos órgãos avaliados (**Tabela 6**).

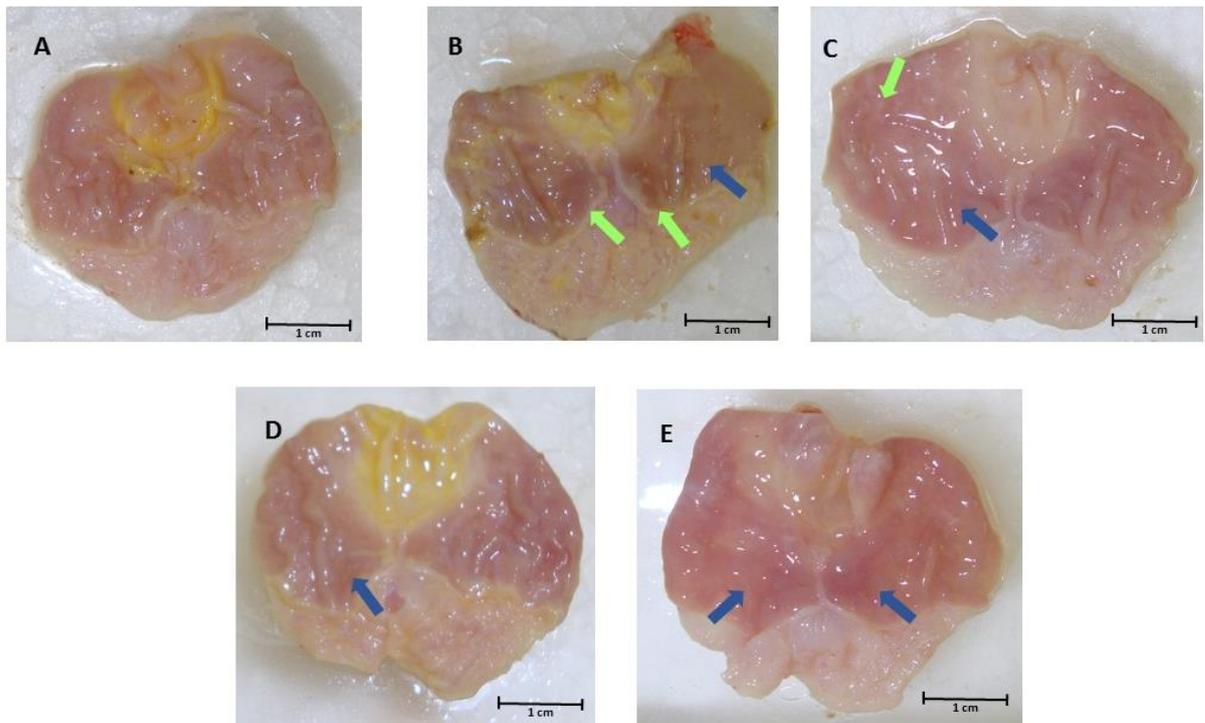
**Tabela 6** – Efeito do FE sobre o ganho de peso e pesos relativos de fígado, rins e coração em animais com monoartrite induzida por ACF tratados por 14 dias. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \* $p < 0,05$ ; vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).

Grupos	Parâmetros avaliados			
	Ganho de peso	Fígado	Rins	Coração
Veículo	17,67 $\pm$ 5,99	3,18 $\pm$ 0,38	0,73 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,07
Indometacina	5,66 $\pm$ 7,94*	3,76 $\pm$ 0,18*	0,84 $\pm$ 0,05*	0,42 $\pm$ 0,08
FE 25 mg/kg	11,67 $\pm$ 2,25	3,14 $\pm$ 0,35	0,74 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,05
FE 50 mg/kg	17,83 $\pm$ 1,72	3,19 $\pm$ 0,50	0,71 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,06
FE 100 mg/kg	19,83 $\pm$ 6,31	3,13 $\pm$ 0,31	0,73 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,03

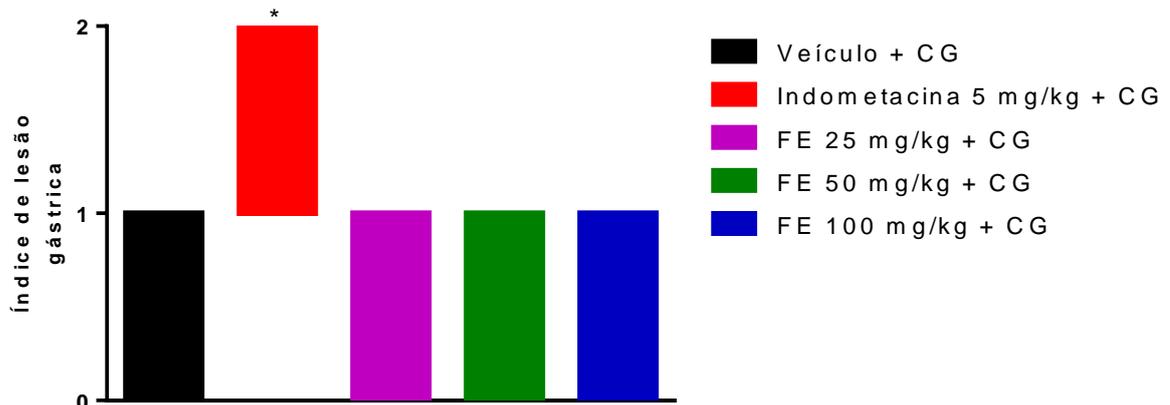
#### 4.18. Atividade ulcerogênica em animais com monoartrite induzida por ACF tratados diariamente com FE

Quanto ao índice de lesão gástrica, os animais tratados com indometacina 5 mg/Kg apresentaram maior nível de lesão da mucosa como expresso nas **Figuras 26 e 27** com sinais extensos de edema e áreas de eritema. O FE em todas as doses testadas apresentou pequenas áreas de edema e, em caso isolado, regiões de eritema não significativas.

**Figura 26** – Fotografias representativas da mucosa gástrica de ratos submetidos a tratamento crônico com FE. Legenda: **A)** veículo, **B)** indometacina (5 mg/kg, v.o.), **C, D e E,** FE 25, 50 e 100 mg/kg v.o respectivamente) e mostra: **→** regiões de edema e **→** áreas de eritema.



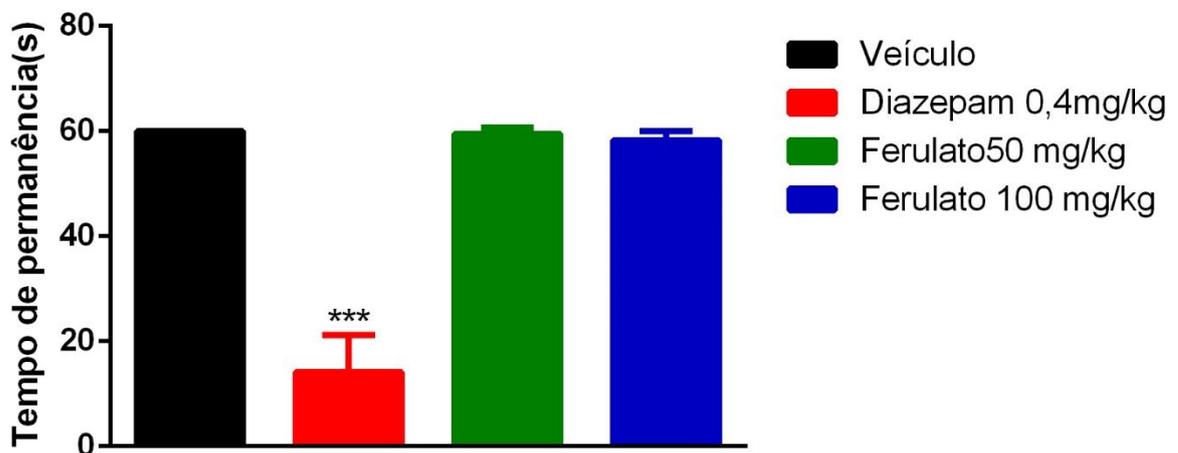
**Figura 27** – Índice de lesão gástrica em animais com monoartrite induzida por ACF tratados por 14 dias com FE (FE, 25, 50 e 100 mg/kg, v.o.), veículo (NaCl 0,9% + 3% tween 80, v.o.) e indometacina (5 mg/kg, v.o.). Os valores estão expressos como mediana, valor máximo e valor mínimo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (Kruskal Wallis e pós teste de Dunn).



#### 4.19. Efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos – Teste do Rota-Rod

O pré-tratamento dos animais com FE nas doses de 50 ou 100 mg/kg não resultou em diminuição da coordenação motora em nenhuma das doses testadas (**Figura 28**). O diazepam (0,4 mg/kg), porém, diminuiu o tempo de permanência na barra rotatória comparado ao grupo veículo ( $14,87 \pm 2,86$ ,  $p < 0,001$ ).

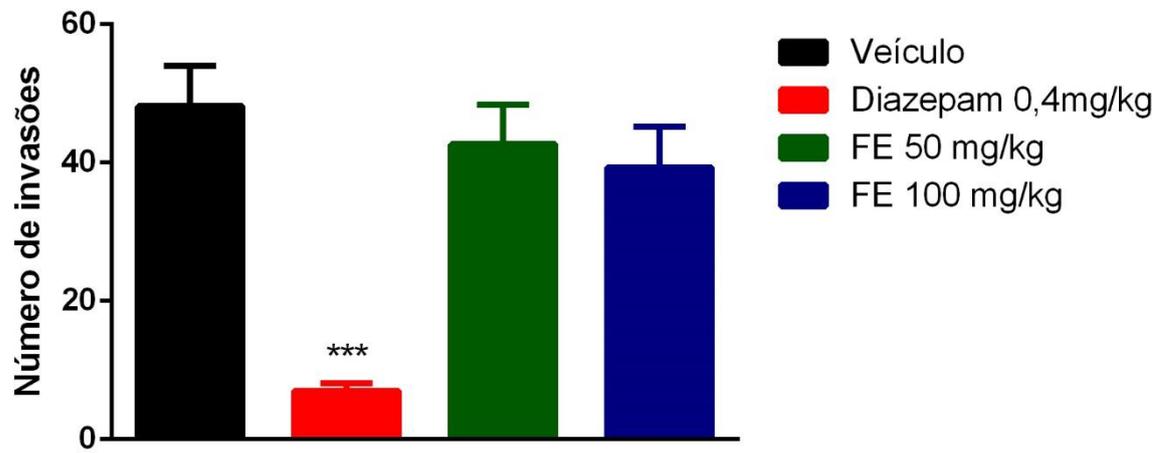
**Figura 28** – Efeito do FE sobre a coordenação motora em camundongos expressa como tempo de permanência na barra rotatória. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



#### 4.20. Efeito do FE sobre a capacidade exploratória em camundongos – Teste do campo aberto

De forma coerente ao modelo de permanência na barra giratória, o diazepam 0,4 mg/kg ( $7,00 \pm 1,07$ ) também resultou em diminuição significativa do número de invasões em relação ao grupo veículo ( $48,17 \pm 5,82$ ) (**Figura 29**). O FE não resultou em alteração da capacidade exploratória de camundongos em nenhuma das doses testadas (50 mg/kg e 100 mg/kg) ( $p > 0,05$ ).

**Figura 29** – Efeito do FE sobre a atividade exploratória em camundongos expressa em número de invasões. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $p < 0,001$  vs veículo (ANOVA one way e pós-teste de Tukey).



# Discussão

## 5. Discussão

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias como terpenos, fenilpropanóis e flavonoides em diferentes concentrações (SÁ et al, 2014). Tais óleos são ricos em substâncias fenólicas, como os fenilpropanóis, e compõem um vasto grupo de metabólitos secundários das plantas com variedade estrutural, de funções biológicas e atividades como antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora e antibiótica (HAMARTHA et al, 2011).

Dentre estas substâncias, o ácido ferúlico, principal produto extraído de *Angelica sinensis* (Oliv.), possui extensas indicações de uso como anti-inflamatório, anticâncer, imunomodulador, neuroprotetor, cardioprotetor, anti-hepatotóxico, renoprotetor e antioxidante (OU; KWOK, 2004; CHAO; LIN, 2011). Apesar dos animadores efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, o ácido ferúlico apresenta baixa absorção e conseqüente biodisponibilidade em decorrência da pouca lipofilicidade (ZHAO; EGASHIRA; SANADA, 2004).

Os derivados esterificados do ácido ferúlico, como o ferulato de etila (FE), conservam a atividade antioxidante agregada à maior lipofilicidade (TEIXEIRA et al, 2013; RAZZAGHI-ASL et al, 2013). Diante do perfil antioxidante e lipofilicidade, a investigação da atividade anti-inflamatória do FE bem como seus mecanismos de ação em diferentes modelos animais de inflamação aguda e crônica validam a realização deste estudo.

Modelos animais têm sido usados extensivamente para investigar a eficácia *in vivo*, o mecanismo de ação e efeitos adversos de plantas e princípios ativos anti-inflamatórios. Devido a heterogeneidade e complexidade das condições inflamatórias, um único modelo de inflamação não permite estudar todos os aspectos da mesma, sendo necessária a utilização de vários modelos, cada um possibilitando o estudo de diferentes aspectos da inflamação (EDDOUKS; CHATTOPADHYAY; ZEGGWAGH, 2012).

Dentre os modelos experimentais, a indução do edema de pata por carragenina tem sido o modelo de escolha para triagem de drogas com atividade anti-inflamatória desde sua descrição por Winter, Risley e Nuss (1969). A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído da alga *Chondrus crispus* que cresce abundantemente em Waterford, Irlanda (DI ROSA, 1972). No protocolo inicial, o

edema de pata induzido por injeção subplantar de carragenina em solução salina foi avaliado imediatamente e 3 horas após a indução tendo como controle a indometacina e descrito como volume do edema (WINTER; RISLEY; NUSS, 1969). A injeção de carragenina produz um edema inflamatório bifásico pela liberação de bradicinina, histamina e serotonina até a primeira hora após a indução (KIRCHHOFF et al, 1990) seguida da produção de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), infiltração neutrofílica, indução da COX-2 e estresse oxidativo da primeira a sexta hora após a indução (GARRELLY; BUREAU; LABREQUE, 1991; SALVEMINI et al, 1996; NANTEL et al, 1999).

Neste estudo, o edema de pata foi efetivamente inibido pelo tratamento com indometacina na dose de 10 mg/kg em todas as horas avaliadas. Tal achado confirma o descrito na literatura, uma vez que a indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal (AINE), inibe ambas as isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) e, por conseguinte, a produção de prostaglandinas e seus efeitos provenientes. Nantel et al (1999) demonstraram inibição da transcrição da COX bem como da produção de prostaglandinas da primeira à quarta hora após indução de edema por carragenina em animais tratados com indometacina. Winter, Risley e Nuss (1969) já haviam utilizado este AINE como padrão no desenvolvimento do modelo experimental.

No tocante à substância teste, o FE, quando administrado na dose de 100 mg/kg diminuiu o edema em todas as horas a partir da primeira, resultado semelhante ao grupo tratado com indometacina. O FE na dose de 50 mg/Kg e 25 mg/Kg inibiu o edema apenas a partir da segunda hora após a indução. Tais resultados sugerem ação do FE em ambas as fases do processo inflamatório induzido por carragenina, seja através da inibição de mediadores como 5-HT, bradicinina e histamina, através da atividade antioxidante ou inibição da COX, iNOS e da liberação de prostaglandinas e óxido nítrico (NO), respectivamente. Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram relatados para outros fenilpropanóis como o eugenol, anetol, cinamaldeído, dilapiol e diidrodilapiol, os quais inibiram a formação do edema induzido por carragenina através de mecanismos relacionados à inibição da síntese de prostaglandinas e NO (BALLABENI et al, 2010; PARISE-FILHO et al, 2011; DOHI et al, 1989; SAEED et al, 1995; RITTER et al, 2013; DOMICIANO et al, 2013).

Outro aspecto importante é a ação de alguns fenilpropanóis, notadamente eugenol e anetol, na inibição do edema de orelha induzido por óleo de cróton (RITTER et al, 2013; DOMICIANO et al, 2013). O óleo de cróton induz inflamação através da

ativação da fosfolipase A2 que, ativada, libera o ácido araquidônico (AA) com subsequente biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas (GÁBOR, 2003). Muito embora tal protocolo não tenha sido realizado neste estudo, a semelhança estrutural entre os fenilpropanóis relacionados e a ação inibitória do FE na formação do edema em ambas as fases da indução de edema por carragenina, sugerem ação do mesmo sobre a via do AA. Tendo ainda em vista a ausência de resposta anti-edematogênica do FE 12,5 mg/kg na inibição do edema de pata elicitado por carragenina, passou-se a avaliar apenas as doses efetivas de 25, 50 e 100 mg/kg.

Diante do efeito positivo do FE nas fases inicial e tardia sobre o edema de pata induzido por carragenina, investigou-se os mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória do FE sobre a migração leucocitária, atividade da enzima mieloperoxidase, concentração de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e NO e atividade de complexos enzimáticos importantes tais como catalase, superóxido dismutase e glutatona reduzida. Para tanto, utilizou-se o modelo de bolsa de ar.

O modelo de bolsa de ar é um dos mais adequados para o estudo da inflamação aguda e de novas drogas com ação anti-inflamatória (JAIN; PARMAR, 2011). A bolsa de ar é formada por injeção subcutânea de ar e após seis dias há a formação de uma linhagem de células que consistem primariamente de macrófagos e fibroblastos (SELYE, 1953). A injeção de carragenina no interior da bolsa de ar induz uma reação inflamatória granulomatosa não-imune, caracterizada pela produção de mediadores químicos incluindo prostaglandinas e leucotrienos, bem como significativo influxo de leucócitos incluindo neutrófilos (MARTIN et al, 1994). Dessa forma, a bolsa de ar simula muitos aspectos da inflamação articular tendo como vantagem o fácil acesso ao exsudato para mensuração de marcadores inflamatórios e contagem de células.

Os resultados mostram que o FE nas doses utilizadas foi efetivo na diminuição do número de leucócitos totais migrados para bolsa de ar, assim como observado no grupo tratado com indometacina. Ação semelhante tem sido relatada na literatura para outros fenilpropanóis tais como a siringina, ácido caféico e o fenetil éster do ácido caféico (MICHALUART et al, 1999; LIZ et al, 2008; YIN et al, 2012). Chama-se atenção para as duas últimas substâncias pela semelhança estrutural ao FE. O extrato butanólico de *Solidago chilensis* Meyen, rico em ácido caféico e ácido clorogênico, diminuiu significativamente a quantidade de leucócitos totais e neutrófilos no exsudato de bolsa de ar (LIZ et al, 2008).

A fim de confirmar a ação inibitória do FE sobre a migração leucocitária, partiu-se então para a mensuração indireta da transmigração e quantidade de leucócitos através da dosagem de mieloperoxidase (MPO). A MPO é a enzima pró-inflamatória mais abundante estocada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, perfazendo cerca de 5% de sua massa seca (PULLI et al, 2013). A mesma catalisa a formação de ácido hipocloroso a partir do peróxido de hidrogênio, tratando-se juntamente com NADPH oxidase, da principal responsável pela produção de radicais livres no sítio inflamatório (KHOTARI et al, 2011). Dessa forma, a MPO traz uma relação íntima com o número de células de onde foi extraída (BRADDLEY et al, 1982).

Os resultados aqui encontrados corroboram com os valores de leucócitos totais relatados anteriormente. Assim, o FE em todas as doses testadas diminuiu significativamente a quantidade de mieloperoxidase no exsudato de bolsa de ar subcutânea em ratos. Resultado semelhante foi encontrado para animais tratados com extrato butanólico de *Solidago chilensis* Meyen, rico em ácido caféico e ácido clorogênico (LIZ et al, 2008). Em modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), o *Y*-orizanol, mistura oleosa de ferulatos, todos fenilpropanóis, resultou em diminuição da atividade da mieloperoxidase após 6 e 8 dias de tratamento por via oral (ISLAM et al, 2008). A diminuição no número total de células e conseqüentemente na MPO pode estar relacionada à diminuição da expressão de moléculas de adesão como observado no tratamento com siringina, um fenilpropanóide glicosilado, que significativamente reduz a expressão da iCAM-1 (YIN et al, 2012).

Sabe-se que a expressão de moléculas de adesão e de sistemas enzimáticos estão, em sua maioria, sob o controle de citocinas e prostaglandinas, produzidas respectivamente por células apresentadoras de antígeno (APCs) e pela via da ciclooxigenase (LEY et al, 2007). Frente a esta hipótese, passou-se a investigar o efeito do FE sobre a expressão de TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , importantes citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2007).

As citocinas são pequenos polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos (OLIVEIRA et al, 2011). Assim como os hormônios clássicos, as citocinas são armazenadas como moléculas pré-formadas e atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras), induzindo quimiotaxia, expressão de moléculas de adesão, sistemas

enzimáticos, amplificação da produção de citocinas e/ou produção de outras citocinas podendo ainda exercer ação anti-inflamatória, por exemplo a IL-10 (NEWTON; DIXIT, 2012). Citocinas estão envolvidas na gênese e agravo de diversas doenças autoimunes como artrite reumatoide e doença de Crohn, de tal forma que as drogas mais avançadas para tais patologias são anticorpos monoclonais anti-citocinas como por exemplo anti-TNF- $\alpha$  (DINARELLO, 2007).

Nossos resultados mostram que o FE reduziu significativamente as concentrações de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  comparativamente ao grupo tratado com veículo. De maneira similar, o extrato butanólico de *Solidago chilensis* Meyen, rico em fenilpropanóides, também reduziu os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (LIZ et al, 2008). O *Y-orizanol*, mistura de ferulatos extraídos da casca do arroz, diminuiu a expressão do mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 após 6 e 8 dias de tratamento por via oral, indicando inibição na transcrição de tais fatores (ISLAM et al, 2008). Ações inibitórias sobre citocinas têm sido relatadas para diversos fenilpropanóis como o cinamaldeído, anetol, metileugenol, cafelato de metila e para o 2-hidroxicinamaldeído (SHIN et al, 2004; LEE et al, 2009; CHAO et al, 2008; CHOI et al, 2010; KANG et al, 2013).

A IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são potentes citocinas pró-inflamatórias produzidas principalmente por macrófagos e neutrófilos, podendo agir sobre o endotélio induzindo a expressão de integrinas ou estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias por outras células imunes (BRADLEY, 2008; BROGGI; GRANUCCI, 2015). As duas citocinas atuam conjuntamente em diversas linhagens celulares para induzir a síntese de IL-6, outra citocina pró-inflamatória que agrava e prolonga o processo inflamatório (FEGHALI; WRIGHT, 1997).

Sabe-se que tanto para a síntese quanto para a efetivação da sinalização dessas citocinas faz-se necessário o fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (HANADA; YOSHIMURA, 2002). O NF- $\kappa$ B tem sido considerado como a via de sinalização pró-inflamatória protótipo, baseado em sua ação em duas frentes: ativação por citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , bem como seu papel na expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009).

A via de sinalização do NF- $\kappa$ B possui inúmeros componentes que regulam sua atividade positivamente ou negativamente (PASPAKARIS, 2009). Mediante estimulação celular, o inibidor do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) é fosforilado e sofre degradação proteossômica. Após degradação do complexo inibidor, os dímeros de NF- $\kappa$ B são hábeis para atravessar a membrana nuclear, acumularem-se no núcleo e ativar a

transcrição gênica e posterior tradução de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e enzimas como a COX-2 e iNOS (BONIZZI; KARIN, 2004; WULLAERT; BONNET; PASPAKARIS, 2011).

Tais eventos estão relacionados e coordenam os eventos da segunda fase do edema induzido por carragenina que culminam do aumento dos níveis de prostaglandinas, provenientes da via do AA e da concentração de óxido nítrico, em decorrência da expressão e atividade da iNOS que produz NO na faixa de micromolares (MOLACE, 2005).

Derivados do ácido hidroxicinâmico como cicloartenil ferulato, curcumina e fenetil ester do ácido caféico têm sido apontados com atividade supressora do NF- $\kappa$ B, provavelmente através de suas atividades antioxidantes diretas ou através da indução da transcrição e expressão de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e glutathione peroxidase (NAGASAKA et al, 2007). Estudo realizado demonstrou inibição da translocação da subunidade p65 em macrófagos Raw 264.7 induzidos com LPS quando tratados com FE (ISLAM et al, 2009).

Resultados disponíveis na literatura mostram que alguns fenilpropanóis como siringina, eugenol, trans-cinamaldeído, metil éster do ácido caféico e ácido clorogênico inibem significativamente a produção da prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (YIN et al, 2012; SAEED et al, 1995; LIZ et al, 2008; BALLABENI et al, 2010; MICHALUART, et al, 1999). A diminuição na concentração de prostaglandinas vem acompanhada de uma série de outras alterações, no geral, em decorrência da inibição do NF- $\kappa$ B. Shin et al (2004), por exemplo, utilizando o cafelato de metila, um derivado do ácido caféico, e por tanto, um fenilpropanóide, demonstraram ação anti-inflamatória através da inibição da PGE<sub>2</sub>, da iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B. Ressalta-se aqui, a semelhança estrutural entre o cafelato de metila e o FE que diferem apenas na posição das hidroxilas no anel aromático e o radical da esterificação, sendo na primeira uma metila e na última uma etila.

Outra justificativa plausível para a diminuição nas concentrações de PGE<sub>2</sub> seria a inibição da ciclooxigenase-2. Como discutido anteriormente, as prostaglandinas são produtos da degradação do AA pela ação das ciclo-oxigenases (MORITA, 2002). Em condições basais, não patológicas, são produzidas, pela COX-1 na maioria dos tecidos, em pequenas concentrações (SIMON, 1999). Diante de um agente agressor, entretanto, a enzima COX-2 passa a ser expressada e produz quantidades muito

maiores de prostaglandinas desencadeando seus efeitos pró-inflamatórios (WILLOUGHBY; MOORE; COLVILLE-NASH, 2000).

Tal afirmativa vem acompanhada de dados expressivos indicando a inibição da COX por diferentes produtos naturais como extratos vegetais e seus componentes isolados, incluindo fenilpropanóis e derivados do ácido cinâmico em geral. Estudo realizado a fim de identificar substâncias inibidoras diretas das enzimas COX-1 e COX-2 foi realizado por Cao et al (2010) tendo em vista inúmeras plantas com atividade anti-inflamatória. Dentre os constituintes com tal atividade o fenetil transferulato, correlato de FE, apresentou 44% de inibição da COX-1 e 25% da COX-2 em concentrações relativamente baixas sendo 18  $\mu$ M e 30  $\mu$ M respectivamente, com seletividade à COX-2 de 0,58.

Outro estudo demonstrou importante inibição da COX-1 e COX-2 por frações de *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera, planta da família Asteraceae rica em fenilpropanóis e especialmente ésteres do ácido ferúlico (D'ALMEIDA et al, 2013). Adicionalmente, em estudo realizado por Hosoda et al (2002), o FE não apresentou atividade supressora do gene da COX-2 na linhagem de células DDL-1 de câncer de cólon. Ressalta-se que os estudos realizados por Cao et al (2010) e D'Almeida et al (2013) referem-se a avaliações de ligação direta e funcional da COX, respectivamente, enquanto, Hosoda et al (2002) avaliaram a expressão gênica da COX-2. Tais resultados em conjunto podem indicar ação inibitória direta sobre a enzima COX-2 e não a supressão do gene.

Ainda referente à diminuição da concentração de citocinas, a atividade regulatória exercida pelo NO da ativação do NF- $\kappa$ B, COX-2 e conseqüentemente PGE<sub>2</sub> pode estar envolvida. O óxido nítrico é um gás continuamente sintetizado pelas enzimas dependentes do sistema cálcio-calmodulina, as óxido nítrico sintases (NOS) (DEJAM et al, 2004). Tal molécula exibe diversas funções fisiológicas, tais como vasodilatação e controle da pressão arterial, prevenção da agregação plaquetária, inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular e neurotransmissor. Quando, no entanto, liberado em concentrações supra fisiológicas, por ação da iNOS, o NO possui ações citotóxica e citostática (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Além disso, vias contra regulatórias conectam as concentrações de óxido nítrico, a expressão de COX-2 e a produção de prostaglandinas (D'ACQUISTO et al, 2001; MOLLACE, 2005). Há evidências de que a liberação basal de NO pela eNOS (óxido nítrico sintase constitutiva endotelial) mantém a iNOS (óxido

nítrico sintase induzível) em estado não ativado através da inibição da sinalização pelo NF- $\kappa$ B, que por sua vez regula o mecanismo de transcrição da iNOS, o que gera aumento na concentração de NO (SALVEMINI, 1995; D'ACQUISTO et al, 2001).

Diante do exposto, passou-se a averiguar a ação do FE sobre a concentração de produtos do metabolismo do óxido nítrico no exsudato de bolsa de ar em ratos. Fatores como baixa concentração e meia-vida extremamente curta (4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos) dificultam a dosagem do NO em amostras biológicas, sendo necessários métodos e tecnologias avançadas (como a ressonância eletrônica para-magnética e a quimioluminescência) (GRAU et al, 2007). A determinação indireta pode ser feita por dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio) (SUN et al, 2003). Dentre os métodos indiretos, o de Griess é o mais difundido e aqui utilizado.

O FE diminuiu significativamente as concentrações de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em todas as doses testadas. Resultados similares foram demonstrados para o anetol (KHANG et al, 2013), 2-hidroxicinamaldeído (LEE et al, 2005), e extrato de *Solidago chilensis* Meyen (LIZ, et al, 2008) e trans-cinamaldeído (BALLABENI et al, 2010). Concomitante à alteração nos níveis de NO, os estudos têm observado ação supressora da transcrição da iNOS justificando assim a ação final. Dessa forma, fenilpropanóis como o ácido ferúlico, 2-hidroxicinamaldeído e anetol também suprimiram a iNOS (LEE et al, 2005; KHANG et al, 2013; MANCUSO; SANTANGELO, 2014). Culturas de macrófagos RAW 264.7 sensibilizadas por LPS e tratadas com  $\gamma$ -oryzanol e cicloartenil ferulato apresentaram menores concentrações de NO, taxa de ativação do Nf- $\kappa$  $\beta$  e supressão da transcrição da iNOS, COX-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (NAGASAKA et al, 2007). Os resultados aqui expressos e dados publicados por Perluigi et al (2006) e Joshi et al (2006), em pesquisas distintas, onde o FE diminuiu significativamente a expressão da iNOS em culturas neuronais, sustentam tal mecanismo de ação para o FE.

Em concentrações fisiológicas, apesar de tratar-se de um radical livre, o óxido nítrico exerce ação antioxidante pela indução da enzima superóxido dismutase (SOD) diminuindo a quantidade de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e evitando a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um radical livre altamente reativo que surge da reação entre NO e  $\text{O}_2^-$  (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Como discutido anteriormente, o aumento dos radicais livres no modelo de edema de pata é um fator importante que ocorre durante a segunda fase do modelo.

Tais radicais livres possuem duas origens: a via da óxido nítrico sintase, já discutida, e as espécies reativas derivadas do oxigênio provenientes principalmente da NADPH oxidase. NADPH oxidase é a enzima que catalisa a produção do ânion superóxido a partir do oxigênio e NADPH e está presente em fagócitos como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos (BABIOR, 2004; JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). A resposta conjugada do NO e  $O_2^-$  bem como a formação do peroxinitrito geram amplificação da resposta inflamatória máxima devido à ativação do NF- $\kappa$ B a partir da terceira hora (SALVEMINI, 1996; MOLLACE ET AL, 2005). Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na ativação do complexo IKK levando a fosforilação do I $\kappa$ B e ativando o NF- $\kappa$ B (NAGASAKA et al, 2007).

Os efeitos do estresse oxidativo podem ser revertidos ou minimizados através do tamponamento dos radicais livres, tamponamento esse que pode ser realizado pelo aumento dos mecanismos de defesa intracelulares, como aumento das enzimas antioxidantes, ou pelo uso de determinados compostos derivados de plantas (CALABRESE et al, 2008). Estudos recentes têm demonstrado que fitoquímicos com capacidade antioxidante desempenham papel fundamental na inativação da via de sinalização do NF- $\kappa$ B através da expressão de complexos enzimáticos desintoxicantes tais como catalase, sistema glutathiona peroxidase/ glutathiona S-transferase e quinona oxi-redutase (SURH, 2008).

A indução das enzimas antioxidantes, ou detoxificação de fase II, representa um dos mais importantes componentes dos mecanismos de defesa celular e, dessa forma, a variedade de tóxicos eletrofílicos e oxidativos podem ser eliminados das células antes da lesão genômica do DNA (NGUYEN; NIONI; PICKETT, 2009; BANERJEE, 2012; LUGRIN et al, 2014). Baseado nestes dados, avaliou-se a ação do FE sobre três importantes enzimas: a superóxido dismutase (SOD), glutathiona e catalase a fim de averiguar se o FE atua por esta via.

Em condições fisiológicas a SOD age como uma defesa celular que degrada o  $O_2^-$  em oxigênio e peróxido de hidrogênio, o qual posteriormente é eliminado por ação da catalase ou glutathiona peroxidase (YASUI; BABA, 2006). Durante o processo inflamatório, a degradação do ânion superóxido pela SOD impede que o mesmo induza a produção de citocinas, expressão de moléculas de adesão e de agentes quimiotáticos (LI; ZHOU, 2011). Neste estudo, para avaliação da atividade da SOD, utilizou-se método de detecção indireta da atividade da enzima, que consiste na capacidade da SOD inibir a formação de nitrito através da reação entre  $O_2^-$  gerado

pela exposição da riboflavina à luz e hidroxilamina. Dessa forma, quanto maior a concentração de  $\text{NO}_2^-$  menor a atividade da enzima superóxido dismutase (DAS; SAMANTA; CHAYNE, 2000). A partir desta metodologia, observou-se que o FE inibiu significativamente a produção de nitrito em todas as doses testadas, ou seja, o grupo veículo apresentou menor quantidade de SOD que os grupos tratados com FE. Resultado similar foi encontrado em culturas de macrófagos sensibilizados com LPS e tratados com *γ*-oryzanol e cicloartenil ferulato onde houve aumento da transcrição da SOD, sugerindo que o FE possa, também, induzir a transcrição de tal enzima (NAGASAKA et al, 2007).

Outra possibilidade de mecanismo de ação para o FE aumentar a ação da superóxido dismutase é a inibição da produção de  $\text{O}_2^-$  pela NADPH oxidase. Tal hipótese foi demonstrada por Nazaré et al (2014) que avaliou a ação do FE sobre a produção de radicais livres por células polimorfonucleares ativadas por zymosan e observaram diminuição significativa na produção de ROS, incluindo o ânion superóxido, sugerindo ação sobre o complexo enzimático NADPH oxidase.

Outros dois complexos enzimáticos que protegem as células contra radicais livres foram avaliados: a glutathiona através da concentração de tióis totais e a atividade da catalase. A glutathiona, consiste em um complexo enzimático formado por quatro elementos o GSH (glutathiona reduzida), GSSH (glutathiona oxidada ou glutathiona dissulfeto), GPx (glutathiona peroxidase) e GRd (glutathiona redutase) (MARTIN; TEISMANN, 2009). Através deste sistema, os radicais livres são removidos por mecanismo não enzimático via redução com GSH, enquanto que a remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrogênio) exige a ação catalítica da GPx (LUBOS et al, 2011). Ambas as reações levam a geração de GSSH a qual é reduzida a GSH por ação da GRd que utiliza NADPH como co-fator (MARTIN; TEISMANN, 2009). Diante do estresse oxidativo gerado pela inflamação, há indução da GPx através da via clássica keap1-Nrf2, culminando com a remoção de hidroperóxidos, aumento da proliferação celular, inibição da apoptose e inibição da expressão da COX-2 e conseqüentemente da inflamação (BRIGELIUS-FLOHÉ; KIPP, 2012). Além disso, a inibição do TNF- $\alpha$  e IL-1 acompanham tais alterações por mecanismos ligados às mesmas vias citadas anteriormente (MOUTET et al, 1998; LUBOS et al, 2011). Ratos com alimentação suplementada com 0,1 e 1% de FE apresentaram maior concentração de tióis totais nos rins e cólon (BOLLING et al, 2011). Neste sentido, o FE e os demais ésteres do ácido ferúlico apresentaram atividade protetora ao estresse oxidativo induzido por

peróxido de hidrogênio em linhagem de células de feocromocitoma humano (PC12) (GARRIDO et al, 2012). Os resultados aqui obtidos mostram aumento da concentração de tióis totais nos grupos tratados com FE, demonstrando aumento dos elementos do complexo da glutatona.

A principal função da catalase é a decomposição a água e oxigênio do peróxido de hidrogênio proveniente, em grande parte, da NADPH oxidase que primariamente produz  $O_2^-$ , o qual é rapidamente dismutado pela SOD em  $H_2O_2$  (KODYDKOVÁ et al, 2014). A catalase tem sido ainda apontada como indutora da iNOS e COX-2 através da via do NF- $\kappa$ B (JANG et al, 2004; JANG et al, 2005). Tal via de ativação do NF-  $\kappa$ B exerce ação contra-reguladora diante de baixas concentrações de radicais livres inibindo a expressão de catalase (MORGAN; LIU, 2011). O ácido ferúlico, por exemplo, age principalmente através da inibição da COX-2, iNOS e da inibição da formação de radicais livres. Em parte, estas atividades devem-se ao aumento da expressão de enzimas antioxidantes como catalase e superóxido dismutase (MANCUSO; SANTANGELO, 2014). Neste estudo, o tratamento dos animais com FE resultou em maior atividade da enzima catalase.

Outras enzimas do sistema de desintoxicação antioxidante também foram relatadas para serem reguladas pelo FE e alguns de seus correlatos. O ácido ferúlico aumenta a expressão da heme-oxigenase (HO-1) e quinona redutase, enquanto o FE induz os sistemas tireodoxina, quinona redutase (CALABRESE et al, 2008; MANCUSO; SANTANGELO, 2014). O FE também induziu a heme-oxigenase em cultura de astrócitos e neurônios em diferentes concentrações (1-25  $\mu$ M) (SCAPAGNINI et al, 2004). Joshi et al (2006) encontraram resultados semelhantes em gérbilos tratados oralmente com FE na dose de 150 mg/kg em modelo experimental de doença de Alzheimer, e observaram aumento da expressão da HO-1 bem como diminuição da peroxidação protéica e da expressão da iNOS.

Estudos recentes têm demonstrado ainda a capacidade do FE de induzir genes responsáveis pela codificação de proteínas capazes de manter a homeostase celular em condições de estresse, incluindo as HSP 32, 60 e 70 (do inglês "heat shock protein") e o sistema tireodoxina (CALABRESE et al, 2008). Em cultura de fibroblastos humanos sob estresse oxidativo induzido por  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio), a exposição prévia das células ao FE na concentração de 25 $\mu$ Mol/L resultou em restauração da viabilidade celular em relação ao grupo controle, além de redução da peroxidação lipídica e protéica e aumento da expressão da HO-1 (enzima

hemeoxigenase) e da proteína HSP-70 (CALABRESE et al, 2008). Tais proteínas são chaperonas, expressas diante de situações de estresse celular e que desempenham função importante rearranjando moléculas protéicas danificadas por conta do estresse oxidativo, por exemplo (TKÁČOVÁ; ANGELOVIČOVÁ, 2012). Tal função faz-se importante especialmente em condições como inflamação e câncer onde radicais livres reagem com proteínas, DNA e RNA, modificando suas estruturas e prejudicando a função celular (TAMURA et al, 2012; JEGO et al, 2013).

A peroxidação de lipídios é especialmente danosa por conta da formação de produtos da peroxidação lipídica que propagam a reação de radicais livres aumentando a área de dano (CATALÁ, 2009). A mesma tem sido mencionada na gênese de várias doenças como aterosclerose, catarata, artrite reumatoide e desordens neurodegenerativas (NIKI et al, 2005).

Quando oxidados, os lipídios geram uma grande diversidade de aldeídos dentre os quais alguns são altamente reativos e podem ser considerados como segundos mensageiros tóxicos como o 4-hidróxi-2-nonenal, 4-hidróxi-2-hexenal e malondialdeído, por causarem lesão protéica ao reagirem com grupos lisina, cisteína e histidina (NIKI, 2009). A formação de produtos da peroxidação lipídica está associada à ativação do NF- $\kappa$ B e posterior transcrição de fatores pró-inflamatórios, através de vias associadas a mitógenos (MAPK) pela ativação direta ou ativação indireta através de proteínas oxidadas (YADAV; ROMANA, 2013).

Dessa forma, após avaliação dos mecanismos de defesa antioxidante através da avaliação da atividade ou marcadores das enzimas avaliou-se o dano causado pelo estresse oxidativo inflamatório sobre os lipídios de membrana (peroxidação lipídica) por meio da concentração de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) determinada pela formação de complexos em alta temperatura e baixo pH entre o ácido tiobarbitúrico e componentes reativos a ele, principalmente o malondialdeído (LIMA; ABDALLA, 2001). Neste estudo, os animais tratados com FE apresentaram concentração significativamente menor de TBARS comparados ao grupo veículo. Em parte, esta resposta pode ser justificada devido ao aumento dos mecanismos de defesa antioxidante, especialmente da glutathione, visto seu papel na redução dos hidroperóxidos pelo sistema da GPx e glutathione-S-transferase (GST) (NIKI et al, 2005). Outra possibilidade é o tamponamento direto dos radicais livres pelo aumento das defesas antioxidantes, como sugerido pelos experimentos realizados anteriormente para SOD, glutathione e catalase.

Consonante aos resultados até aqui discutidos, o FE mostra-se como uma substância promissora devido sua capacidade antioxidante direta e indireta através da indução de sistemas antioxidantes. Resultados semelhantes aos aqui expressos foram mostrados em estudo realizado por Islam et al (2008) em modelo de colite induzida por dextran sulfato de sódio (DSS), onde o  $\gamma$ -oryzanol, mistura oleosa de ferulatos e todos fenilpropanóis, resultou em melhora do índice da doença, diminuição da atividade da mieloperoxidase, translocação da unidade p65 do Nf- $\kappa$ B bem como resultou em diminuição da expressão do mRNA de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 e IL-6 após 6 e 8 dias de tratamento por via oral. Nyström et al (2005) avaliaram a capacidade antioxidante do farelo de trigo e centeio, ricos em  $\gamma$ -oryzanol, e constataram significativos perfil antioxidante *in vitro* em modelo de DPPH e em meios lipídicos. Outros estudos com o  $\gamma$ -oryzanol avaliaram a capacidade antioxidante direta, observando a diminuição na quantidade de espécies reativas derivadas do oxigênio e ensaios de viabilidade celular sob estresse oxidativo, como os estudos realizados por Perluigi et al (2006) que observou diminuição nas concentrações de proteínas carbonílicas (frutos da oxidação por hidroperóxidos) e na quantidade de espécies reativas de oxigênio. San Miguel et al (2012) em estudo semelhante observaram aumento da viabilidade celular através da diminuição de radicais livres em fibroblastos orais submetidos a estresse oxidativo.

Diante dos resultados favoráveis à atividade anti-inflamatória aguda e antioxidante, buscou-se avaliar o efeito do FE sobre modelos de inflamação aguda e crônica. Para estudar os mecanismos patológicos da dor artrítica, vários modelos experimentais que mimetizassem a artrite humana foram desenvolvidos (YU et al, 2002). Nesse estudo foram utilizados modelos de monoartrite de joelho aguda (induzida por carragenina) e crônica (induzida por Adjuvante Completo de Freund – ACF) avaliadas através do teste de incapacitação articular usado como medida da perda de funcionalidade mediante processo inflamatório (*functio laesa*) (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

Método de avaliação desenvolvido por Tonussi e Ferreira (1992), o incapacitômetro permite avaliar a incapacidade articular em ratos de maneira objetiva e independente do observador, sensível para novas drogas analgésicas e anti-inflamatórias. Neste modelo, o tempo de elevação da pata (TEP) dos animais sem estimulação articular varia em torno de 10 a 15 segundos, enquanto a injeção intra-

articular de substâncias algogênicas causa elevação deste valor, indicando o desenvolvimento de incapacitação articular (VALE et al, 2006).

A indução de artrite por injeção intra articular de carragenina apresenta padrão de desenvolvimento semelhante ao apresentado para o edema de pata induzida pelo mesmo agente. A incapacitação máxima é atingida em torno da terceira a quarta e tende a cessar após 6 horas da indução (TONUSSI; FERREIRA, 1994). Dessa forma, moderado exsudato neutrofílico pode ser observado após 3 horas de indução, além disso, após 24 horas há a invasão de tecidos adjacentes incluindo a cápsula articular e hiperplasia da membrana sinovial (GOULART et al, 2005).

O FE foi efetivo na redução do TEP e do edema de joelho avaliados em modelo de monoartrite induzida por carragenina. Tal qual descrito por Tonussi e Ferreira (1994), a incapacitação máxima e o edema ocorreram entre a terceira e quarta horas. Os animais tratados com FE apresentaram diminuição da incapacitação articular e edema a partir da segunda hora após a indução, sendo o grupo tratado com FE 100 mg/kg o que apresentou maior inibição de ambos os parâmetros avaliados.

Entretanto drogas com atividade depressora sobre o sistema nervoso central como o diazepam, geram um falso positivo nestes testes, devido às alterações na coordenação e estado vigil dos animais, diminuindo assim o tempo de elevação da pata (TONUSSI; FERREIRA, 1992).

Tendo isso em vista, partiu-se para avaliação do efeito do FE sobre a atividade exploratória e coordenação motora de camundongos através dos testes de campo aberto e barra giratória ou rota-rod. Os resultados obtidos não demonstraram atividade depressora do sistema nervoso central para os animais tratados com FE nas doses de 50 e 100 mg/kg. Tal efeito é positivo pois, mesmo diante de maior lipossolubilidade e consequente facilidade na travessia da barreira hematoencefálica, o FE expressa os mesmos resultados que o ácido ferúlico, tido inclusive como importante agente antidepressivo (TUA et al, 2012; ZENI et al, 2012).

A importância do TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na incapacitação articular induzida por LPS foi demonstrada por Bressan, Cunha e Tonussi (2006), onde animais tratados com injeção intra-articular de soro anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1 $\beta$  apresentaram edema de pata, TEP (tempo de elevação da pata), além de contagem de células totais, mononucleares e polimorfonucleares significativamente menores em relação ao grupo controle. Além disso, PGE<sub>2</sub> e a via do NO também têm sido implicados na nocicepção gerada pela artrite induzida por carragenina (TONUSSI; FERREIRA, 1994).

Tomados em conjunto, os dados até aqui apresentados sugerem que a ação do FE sobre a migração celular, níveis de NO e citocinas, marcadamente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , importantes agentes na instalação da monoartrite induzida por carragenina, sejam os principais fatores para a redução do edema e incapacitação articular.

A dor é um importante sintoma na artrite. Desta forma, o acesso a padrões comportamentais em modelos animais de artrite humana consiste em valioso passo para o desenvolvimento de alternativas farmacológicas para o tratamento da dor e inflamação (MIN et al, 2001). Dentre os modelos que mimetizam tal enfermidade destaca-se a artrite induzida por ACF.

O adjuvante completo de Freund consiste em um tipo de emulsão de água-em-óleo composta por micobactérias inativadas, *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum*. No geral, o protocolo consiste de uma ou várias injeções de ACF como sensibilizante seguida de, várias semanas ou meses, de uma ou várias injeções *booster* (BILLIAU; MATTHYS, 2001). A monoartrite induzida por ACF consiste em edema e vermelhidão dose-dependente (DONALDSON; SECKL; MCQUEEN, 1993). Tal procedimento gera resposta inflamatória com forte celularidade, marcadamente linfócitos T, e anticorpos antígeno-específicos circulantes. Várias citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e inúmeras quimiocinas são induzidas pelo ACF, mimetizando em vários aspectos a fisiopatologia de um processo inflamatório crônico (CHILLINGWORTH; DONALDSON, 2003).

Dados publicados recentemente, revelam que o tempo de deambulação no incapacitômetro, um minuto, é o tempo ideal. Deambulações por maior tempo resultam em diminuição da incapacitação, infiltrado celular e edema articular em modelos de artrite induzida por ACF provavelmente devido ao efeito da mobilização articular e liberação de  $\beta$ -endorfinas (GOMES et al, 2014).

O modelo de monoartrite induzida por ACF utilizado nesta pesquisa, consistiu em injeção subcutânea na base da cauda e, após 21 dias, os animais receberam uma segunda injeção de ACF intra articular, na articulação tibiofemural. A partir da segunda administração de ACF os animais foram monitorados quanto à formação do edema do joelho e o TEP durante 14 dias. Nesse sentido, o FE foi efetivo na redução tanto do edema quanto do TEP já a partir da 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> horas, respectivamente. Resultados semelhantes têm sido observados em estudos com produtos naturais como polifenóis extraídos do coco, *Semecarpus anacardium* Linn, *Desmodium gangeticum* DC

(RAMPRASATHA; SHANTHID; SACHDANANDAM, 2005; GOVINDARAJAN et al, 2006; VYSAKH et al, 2014).

Yu et al (2002) documentaram e validaram o método de avaliação do ângulo de extensão do joelho de ratos com artrite induzida por ACF, observando diminuição deste ângulo à medida que o processo inflamatório se instala, acompanhado do aumento do volume do joelho. Tal observação justifica em parte o maior tempo de elevação da pata observado nestes modelos de incapacitação articular. Provavelmente o maior TEP advém da associação entre a dor e a diminuição da amplitude de extensão do joelho, podendo ainda estar associada a modificações estruturais da articulação artrítica.

É sabida a importância das citocinas na inflamação elicitada por ACF. Nesse sentido, no edema de pata induzido por ACF, o bloqueador dos receptores de IL-1, receptor IL-1Ra, reduz parcialmente a hiperalgesia em ratos e camundongos. Entretanto, dentre as citocinas, é o TNF- $\alpha$  que exerce função principal no direcionamento do processo inflamatório e instalação das alterações estruturais dos tecidos afetados (RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005).

Anticorpos contra TNF- $\alpha$  podem bloquear a hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de carragenina ou ACF. Tal efetividade é confirmada em animais *knockout* para receptores de TNF- $\alpha$  com hiperalgesia significativamente menor comparativamente a animais selvagens (TONUSSI; FERREIRA, 1999; RITTNER; MACHELSKA; STEIN, 2005). Banchet et al (2009) demonstraram que no modelo de monoartrite induzida por ACF, o TNF- $\alpha$  induz migração de macrófagos para os gânglios dorsais, responsáveis pela aferência dolorosa, e por tanto, intensificando e cronificando o quadro algico.

Tais resultados demonstram que o FE exerce função moduladora da artrite induzida por ACF mediante modulação das concentrações de IL-1 $\beta$  e especialmente TNF- $\alpha$ . Essa ação pode ser explicada pela menor migração de leucócitos e consequente menor liberação de citocinas.

Concomitante às avaliações de TEP e edema de joelho, foram realizados registros radiográficos para controle das alterações estruturais desenvolvidas durante os 14 dias de artrite induzida por ACF. Adotou-se o protocolo de registro basal (no dia da indução) a fim de demonstrar a integridade das estruturas articulares e outros dois registros no 7º dia e 14º dia após a indução com o intuito de avaliar a evolução no meio do período e no desfecho do protocolo.

Os resultados expressos demonstram que o FE exerceu efeito protetor sobre as estruturas articulares como demonstrado pelos registros radiográficos e pelo índice radiográfico que teve como parâmetros a presença de erosões cartilaginosas, ósseas e edema de partes moles (CUZZOCREA et al, 2000).

Fator importante acerca do protocolo de monoartrite induzida por ACF é a similaridade entre o grau de destruição articular e os padrões de marcha. Dessa forma, os grupos de animais com piores padrões de marcha, ou seja, maiores TEP apresentariam maior desgaste articular (BOETTGER et al, 2009). Tal afirmativa vai de encontro aos resultados aqui expostos baseados no TEP e nos registros radiográficos das articulações no dia da indução, após sete e 14 dias onde os animais tratados com FE e indometacina 5 mg/kg apresentaram menos dano articular comparados ao grupo controle. Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram relatados para os extratos de *Careya arbórea* Roxb e *Terminalia paniculata* Roth, ricas em fenilpropanóides (TALWAR et al, 2011; RAYHANA et al, 2014).

O processo de lesão articular inicia-se devido a situação de estresse tecidual que permite que receptores *Toll-like* sejam ativados por moléculas endógenas em tecidos estéreis (DAMPs – *damage-associated molecular patterns*) a qual é uma importante via para ativação do NF- $\kappa$ B e consequente produção de citocinas e quimiocinas (SCANZELLO; GOLDRING, 2012). Característica marcante de articulações artríticas, as áreas de erosão ou reabsorção da matriz óssea são resultado da estimulação da osteoclastogênese pelo TNF- $\alpha$  (LAM et al, 2000). Adicionalmente, o bloqueio de receptores de IL-1 $\beta$  também inibiu a reabsorção óssea (JOOSTEN et al, 1999).

Diante de um processo inflamatório e todas as consequências inerentes a ele há a produção de radicais livres, os quais são altamente lesivos ao DNA dos condrócitos, especialmente o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (HENRONTIN; KURZ; AIGNER, 2005). Particularidade é que os condrócitos de articulações artríticas, em decorrência da lesão do DNA mitocondrial (mDNA), passam a produzir radicais livres e aumentar o estresse oxidativo intra-articular, a crescente deste processo gera ativação da subunidade p53 desencadeando apoptose (GRISHKO et al, 2009). Adicionalmente, em articulações artríticas, o aumento do O<sub>2</sub><sup>-</sup> é acompanhado da diminuição da produção de colágeno do tipo II e da sensibilidade dos condrócitos ao IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) (AFONSO et al, 2007). A soma de tais fatores gera inicialmente a perda da resistência articular e posterior ruptura e apoptose dos condrócitos.

Já foi demonstrado que, em modelos de monoartrite induzida por ACF, a SOD inibe de maneira eficiente a formação de produtos da peroxidação lipídica bem como a formação do edema (YOSHIKAWA; TANAKA; KONDO, 1985). O envolvimento dos radicais livres na gênese dos processos artríticos fortalece a importância, especialmente, da SOD e do sistema da glutathiona e catalase como condroproterores. Concernente a isto, o FE aumentou a atividade da catalase, da SOD bem como as concentrações de tióis totais (marcador do sistema da glutathiona), além da influência sobre as citocinas como discutido anteriormente, elencando-o como um promissor condroprotetor e agente anti-inflamatório para quadros artríticos agudos e crônicos.

Sabe-se que mesmo com o uso dos anti-inflamatórios mais modernos, a presença de efeitos adversos e toxicidade são prevalentes na população em geral (GAUTAM; JACHAK, 2009). Dentre tais efeitos adversos, as lesões gástricas, renais, hepáticas e cardiovasculares principalmente associadas ao uso crônico dos medicamentos, são as mais compreendidas e associadas ao efeito inibidor das enzimas COX-1 e COX-2 (SOSTRES et al, 2010; PERRONE et al, 2010).

Frente a estes problemas e utilizando-se do modelo de monoartrite induzida por ACF, acessou-se ao final do protocolo experimental, após anestesia e eutanásia, o estômago, o qual foi excisado, lavado e exposto para avaliação de sinais de lesão gástrica tais como eritema, edema, hemorragia e ulcerações (CRYER; FELDMAN, 1999). Além disso, foram extraídos o coração, fígado e rins para avaliação do peso relativo de tais órgãos, tomados como indícios de toxicidade junto ao acompanhamento do ganho de peso dos animais.

Os resultados aqui expostos demonstraram que o FE não induziu alteração no peso relativo dos órgãos avaliados e tampouco no ganho de peso dos animais ao longo dos 14 dias de tratamento. Contrariamente, o grupo tratado com indometacina na dose de 5 mg/kg resultou em menor ganho de peso e maiores pesos relativos de rins e fígado. A inflamação intestinal e gástrica pela irritação da mucosa ocasionada pelo tratamento crônico com indometacina pode gerar perda de peso, devido à má absorção dos nutrientes e aumento da motilidade intestinal (YAMADA et al, 1993).

Quanto à lesividade gástrica, o FE apresentou baixo índice de lesão gástrica comparativamente ao grupo indometacina, apresentando apenas pequenas regiões de edema que poderiam facilmente ser ocasionadas pelo procedimento cirúrgico. Esses resultados vão de encontro àqueles disponíveis na literatura em que substâncias fenólicas apresentam atividade gastroprotetora (SABIHA et al, 2011). Tal

efeito é demonstrado para fenilpropanóis como o anetol, eugenol, demetileugenol dentre outros (SAHPAZ et al, 2002; TOGNOLINI, 2007).

A busca por substâncias efetivas e desprovidas, ao menos em parte, de efeitos adversos é contínua (MISHRA; TIWARI, 2011). Devido a diversidade botânica e o uso etnofarmacológico com sucesso de muitas dessas espécies vegetais, a procura por substâncias de origem natural é contínua (OLIVEIRA et al, 2011). A ação através de várias vias efetoras e de sinalização para combater patologias talvez seja o fator principal para a efetividade dos produtos naturais (DINARELLO, 2010).

Em vista às qualidades elencadas anteriormente, o FE figura como uma potencial droga para tratamento de afecções artríticas dentre outras doenças de origem inflamatória, devido à sua ação na redução das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , diminuição da migração celular e combate ao estresse oxidativo além de menor perfil tóxico.

# Conclusões

## 6. Conclusões

As investigações realizadas sobre a ação farmacológica do ferulato de etila (FE) em modelos de inflamação aguda e crônica permitem sugerir que:

- A administração do FE por via oral mostrou atividade antiedematogênica ao reduzir, de forma significativa, o edema de pata induzido por carragenina em ratos;
- O FE reduziu a migração de células leucocitárias em ratos em modelo de bolsa de ar subcutânea ativada por carragenina;
- O FE diminuiu de forma significativa a atividade da mieloperoxidase e concentração de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) do lavado de bolsa de ar subcutânea ativada por carragenina em ratos;
- O FE reduziu significativamente as concentrações de  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  no lavado de bolsa de ar subcutânea ativada por carragenina;
- O tratamento de animais com FE resultou em aumento da atividade da catalase, superóxido dismutase (SOD), da concentração de tióis totais e diminuiu a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- O FE reduziu significativamente o edema articular e o tempo de elevação da pata em ratos no modelo de monoartrite aguda induzida por carragenina;
- O FE reduziu significativamente o edema articular e o tempo de elevação da pata em ratos no modelo de monoartrite crônica induzida por adjuvante completo de Freund (ACF);
- O FE agiu como condroprotetor em modelo de monoartrite crônica induzida por adjuvante completo de Freund observado através de registros radiográficos possivelmente associada à inibição do  $\text{TNF-}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  bem como a ação antioxidante;
- O FE não induziu lesão gástrica significativa, alteração no ganho de peso e peso relativo dos órgãos após 14 dias de tratamento oral consecutivos;
- O FE não apresentou efeito depressor sobre o sistema nervoso central nos testes de campo aberto e rota-rod;

Perspectivas

## 7. Perspectivas

O presente trabalho tem como perspectivas:

- Elucidar os principais mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória do FE (FE) frente à análise de western blotting para iNOS, COX-2, translocação da subunidade p65 bem como da via do ARE (elemento de resposta antioxidante) e MAPK;
- Avaliar a ação do FE sobre a transcrição de citocinas pró e anti-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 através de qT-PCR;
- Analisar a ação do FE pela análise imunohistoquímica do tecido lesionado por indução com ACF;
- Avaliar o efeito do FE sobre parâmetros articulares como colágeno do tipo II e dosagem de proteoglicanos;
- Avaliar o efeito do FE em modelos de hipernocicepção induzida por ACF;
- Desenvolver formas farmacêuticas para uso via oral (comprimidos) e tópico (microemulsão) e testá-las em modelos de inflamação aguda e crônica tendo em vista os parâmetros listados acima;

## REFERÊNCIAS

AFONSO, V; CHAMPY, R; MITROVIC, D; COLIN, P; LOMRI, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. **Joint Bone Spine**, vol. 74, p. 324-329, 2007.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 61, p. 10835–10847, 2013.

ANSELMI, C.; CENTINI, M.; ANDREASSI, M.; BUONOCORE, A.; LA ROSA, C.; FACINO, R. M.; SEGA, A.; TSUNO, F. Conformational analysis: a tool for the elucidation of the antioxidant properties of ferulic acid derivatives in membrane models. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 35, p. 1241–1249, 2004.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Reviews of Ecology Evolution Systematics**. vol. 43, p. 385-406, 2012.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, vol. 16, p. 42–47, 2004.

BAKKALI, F; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, p. 446–475, 2008.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. essential oil: In vitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, vol. 81, p. 289–295, 2010.

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

BANCHET, G. S.; BOETTGER, M. K.; FISCHER, N.; GAJDA, M.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor- $\alpha$ -dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. **Pain**, vol. 145, p. 151–159, 2009.

BANERJEE, R. Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 287, p. 4397–4402, 2012.

BARTOSZ, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? **Biochemical pharmacology**, vol. 77, p. 1303-1315, 2009.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, vol.70, n. 12, p. 849-860, 2001.

BING, R. J.; LOMNICKA, M. Why Do Cyclo-Oxygenase-2 Inhibitors Cause Cardiovascular Events? **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 39, n. 3, p. 521-522, 2002.

BOETTGER, M. K.; WEBER, K.; SCHMIDT, M.; MIECZYSLAW, G.; BRÄUER, R.; SCHAIBLE, H. Gait abnormalities differentially indicate pain or structural joint damage in monoarticular antigen-induced arthritis. **Pain**, vol. 145, p. 142–150, 2009.

BOLLING, B. W.; JI, L. L.; LEE, C.; PARKIN, K. L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

BOLLING, B. W.; JI, L.; LEE, C.; PARKIN, K. L. Dietary supplementation of ferulic acid and ferulic acid ethyl ester induces quinone reductase and glutathione-S-transferase in rats. **Food Chemistry**, vol. 124, pág. 1-6, 2011.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **TRENDS in Immunology**, vol.25, n. 06, p. 280-288, 2004.

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

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, vol. 78, n. 03, p. 206-209, 1982.

BRESSAN, E.; CUNHA, F. Q.; TONUSSI, C. R. Contribution of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CINC-1 for articular incapacitation, edema and cell migration in a model of LPS-induced reactive arthritis. **Cytokine**, vol. 36, p. 83–89, 2006.

BRIEGER, K.; SCHIAVONEA, S.; MILLER JR, F. J.; KRAUSE, K. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, vol. 142, p. 1-14, 2012.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KIPP, A. P. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis. **Annals New York Academic Sciences**. vol. 1259, p. 19–25, 2012.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **British Journal of Psychology**, vol. 48, p. 1-12, 1957.

BROGGI, A.; GRANUCCI, F. Microbe- and danger-induced inflammation. **Molecular Immunology**, vol. 63, p. 127–133, 2015.

CALABRESE, V.; CALAFATO, S.; PULEO, E.; CORNELIUS, C.; SAPIENZA, M.; MORGANTI, P.; MANCUSO, C.. Redox regulation of cellular stress response by ferulic acid ethyl ester in human dermal fibroblasts: role of vitagenes. **Clinics in Dermatology**, vol. 26, p. 358–363, 2008.

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  $\kappa\beta$  (NF-  $\kappa\beta$ ). **Planta Medica**. vol. 69, p. 973-983, 2003.

CAO, H.; YU, R.; CHOI, Y.; MA, Z.; ZHANG, H.; XIANG, W.; LEE, D. Y.; BERMAN, B. M.; MOUDGIL, K. D.; FONG, H. H. S.; BREEMEN, R. B. Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation. **Pharmacological Research**, vol. 61, p. 519–524, 2010.

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and Physics of Lipids**, vol. 157, p. 1–11, 2009.

CHAO, L.K.; HUA, K.F.; HSU, H.Y.; CHENG, S.S.; LIN, I.F.; CHEN, C.J.; CHEN, S.T.; CHANG, S.T. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 46, p. 220–231, 2008.

CHAO, W.; LIN, B. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* (Danggui). **Chinese Medicine**, vol. 06, n. 29, p. 01-07, 2011.

CHILLINGWORTH, N. L.; DONALDSON, L. F. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 128, p.45-52, 2003.

CHOI, Y.K.; CHO, G.S.; HWANG, S.; KIM, B.W.; LIM, J.H.; LEE, J.C.; KIM, H.C.; KIM, W.K.; KIM, Y.S. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression

of oxidative injury and inflammation. **Free Radical Research**. vol. 44, p. 925–935, 2010.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, vol. 55, p. 463-480, 2000.

CRYER, B.; FELDMAN, M. Effects of very low dose daily, long-term aspirin therapy on gastric, duodenal, and rectal prostaglandin levels and on mucosal injury in healthy humans. **Gastroenterology**, vol. 117, p. 17–25, 1999.

CUZZOCREA, S; MAZZON, E.; BEVILAQUA, C; COSTANTINO, G; BRITTI, D.; MAZZULLO, G; DE SARRO, A; CAPUTI, A. P. Cloricromene, a coumarine derivative, protects against collagen-induced arthritis in Lewis rats. **British Journal of Pharmacology**. vol 131, p. 1399– 1407, 2000.

D'ACQUISTO, F.; MAIURI, M. C.; CRISTOFARO, F.; CARNUCCIO, R. Nitric oxide prevents inducible cyclooxygenase expression by inhibiting nuclear factor- $\kappa$ B and nuclear factor-interleukin-6 activation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, vol. 364, p. 157–165, 2001.

D'ALMEIDA, R. E.; ISLA, M. I.; VILDOZA, E. L.; QUISPE, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; ALBERTO, M. R. Inhibition of arachidonic acid metabolism by the Andean crude drug *Parastrephia lucida* (Meyen) Cabrera. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 150, p. 1080–1086, 2013.

DALLE-DONE, I.; ROSSI, R.; COLOMBO, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, vol. 52, n. 4, p. 601–623, 2006.

DAS, K; SAMANTA, L; CHAINY, G. B. D. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, vol 37, p. 201-204, 2000.

DEJAM, A.; HUNTER, C. J.; SCHECHTER, A. N.; GLAADWIN, M. T. Emerging role of nitrite in human biology. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, vol. 32, p. 423–429, 2004.

DI ROSA, M. **Biological properties of carrageenan**. *J. Pharm. Pharmac*, vol 24, p. 89-102, 1972.

DINARELLO, C. A. Historical Review of Cytokines. **European Journal of Immunology**. vol. 37(Suppl 1), p. S34–S45, 2007.

DOHI, T.; TERADA, H.; ANAMURA, S.; OKAMOTO, H.; TSUJIMOTO, A. The anti-inflammatory effects of phenolic dental medicaments as determined by mouse ear edema assay. **Japan Journal of Pharmacology**. vol. 49, p. 535–539, 1989.

DOMICIANO, T.P.; DALALIO, M.M.O.; SILVA, E.L.; RITTER, A.M.V.; ESTEVÃO-SILVA, C.F.; RAMOS, F.; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**. vol. 386, p. 331–338, 2013.

DONALDSON, L. F.; SECKL, J. R.; MCQUEEN, D. S. A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effects of adjuvant dose. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 49, p. 5-10, 1993.

EDDOUKS, M.; CHATTOPADHYAY, D.; ZEGGWAGH, N. A. Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2012, p. 01-14, 2012.

EDEN, W.; VAN DER ZEE, R.; PRAKKEN, B. Heat-shock proteins induce t-cell regulation of chronic inflammation. **Nature Reviews**, vol. 05, n. 04, p. 318-330, 2005.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. vol. 21, p. 308–323, 2007.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 82, p. 70–77, 1959.

ESTROV, Z.; SHISHODIA, S.; FADERL, S.; HARRIS, D.; VAN, Q.; KANTARJIAN, H.M.; TALPAZ, B.; AGGARVAL, B.B. Resveratrol blocks interleukin-1 $\beta$ -induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B, inhibits proliferation, causes Sphase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. **Blood**, vol. 102, p. 987-995, 2003.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, vol. 02, n. 1, p. 12-26, 1997.

FERRERO-MILLANI, L.; NIELSEN, O. H.; ANDERSEN, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. **Clinical and Experimental Immunology**, vol. 147, p. 227–235, 2006.

FIALKOW, L.; WANG, Yi.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 42, p. 153–164, 2007.

FORMAN, H. J.; TORRES, M.. Redox signaling in macrophages. **Molecular aspects of Medicine**, vol. 22, p. 189-206, 2001.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, vol. 8(Suppl 2), n. 07, 2006.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. **Inflammation Protocols**, v. 225 p. 129-137, 2003.

GARRELLY, L.; BUREAU, P.; LABREQUE, G. Temporal study of carrageenan-induced PMN migration in mice. **Agents and Actions**, vol. 33, p. 225-228, 1991.

GARRIDO, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, M.; MIRI, R.; TAVAKKOLI, M.; POURALI, S.; SASO, L.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity. **Biochimie**, vol. 94, p. 961-967, 2012.

GASENAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, vol. 12, p. 306–317, 2008.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, vol. 29, n. 5, 767-820, 2009.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. D. inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews**, vol. 03, n. 04, p. 401-416, 2004.

GOMES, R. P. **Atividade física no tratamento da artrite induzida por adjuvante de Freund: efeitos na nocicepção, edema e migração celular**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Movimento Humano). Universidade Estadual de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2008.

GOMES, R. P.; BRESSAN, E.; SILVA, T. M.; GEVAERDA, M. S.; TONUSSI, C. R.; DOMENECH, S. C. Efeitos de um minuto e dez minutos de deambulação em ratos com artrite induzida por adjuvante completo de Freund sobre os sintomas de dor e edema. **Revista Brasileira de Reumatologia**, vol. 54, n. 02, p. 83-89, 2014.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Molecular and Nutritional Food Research**. vol. 55, p. 74–82, 2011.

GOULART, A. C.; CORREIA, F. A. S.; SOUSA, S. C. O. M.; LUZ, J. G. C. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Brazilian Oral Research**, vol. 19, n. 02, p. 99-105, 2005.

GOVINDARAJAN, R.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; PUSHPANGADAN, P. Antioxidant activity of *Desmodium gangeticum* and its phenolics in arthritic rats. **Acta Pharmacologica**. vol. 56, p. 489–496, 2006.

GRAU, M.; HENDGEN-COTTA, U. B.; BROUZOS, P.; DREXHAGE, C.; RASSAF, T.; LAUER, T.; DEJAMB, A.; KELM, M.; KLEINBONGARD, P. Recent methodological advances in the analysis of nitrite in the human circulation: Nitrite as a biochemical parameter of the L-arginine/NO pathway. **Journal of Chromatography B**, vol. 851, p. 106–123, 2007.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analyses of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GRISHKO, V. I.; HO, R.; WILSON, G. L.; PEARSALL, A. W. Diminished mitochondrial DNA integrity and repair capacity in OA chondrocytes. **Osteoarthritis and Cartilage**, vol 17, p. 107-113, 2009.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 27, p. 1–93, 2006.

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T. Endogenous modulators of inflammatory cell recruitment. **Cell**, vol. 34, n. 01, p. 01-06, 2013.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. **Ann Epidemiol**. vol. 15, p. 686–699, 2005.

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

HARMATHA, J; ZÍDEK, Z; KMONÍČKOVÁ, E; ŠMIDRKAL, J. Immunobiological properties of selected natural and chemically modified phenylpropanoids. **Interdisciplinary Toxicology**. vol. 4, n. 1, p. 5–10, 2011.

HENRONTIN, Y.; KURZ, B.; AIGNER, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? **OsteoArthritis and Cartilage**, vol. 13, p. 643-654, 2005.

HOSODA, A.; OZAKI, Y.; KASHIWADA, A.; MUTOH, M.; WAKABAYASHI, K.; MIZUNO, K.; NORUMA, E.; TANIGUCHI, H. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, vol. 10, p. 1189–1196, 2002.

HOWARD, P. A.; DELAFONTAINE, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 43, n. 4, p. 519-525, 2004.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, vol. 3, n. 01, p. 01-24, 2012.

ISLAM, M. S.; MURATA, T.; FUJISAWA, M.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; BARI, A. M.; HORI, M.; OZAKI, H. Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **British Journal of Pharmacology**, vol. 154, p. 812–824, 2008.

ISLAM, S.; YOSHIDA, H.; MATSUKI, N.; ONO, K.; NAGASAKA, R.; USHIO, H.; GUO, Y.; HIRAMATSU, T.; HOSOYA, T.; MURATA, T.; HORI, M.; OZAKI, H.. Antioxidant, Free Radical–Scavenging, and NF- $\kappa$ B–Inhibitory Activities of Phytosteryl

Ferulates: Structure–Activity Studies. **Journal of Pharmacological Sciences**, vol. 111, p. 328 – 337, 2009.

JAIN, M.; PARMAR, H. S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**. vol. 60, p. 483–491, 2011.

JANG, B.; \*, PAIK, J.; KIM, S.; BAE, J.; MUN, K.; SONG, D.; CHO, C.; SHIN, D.; KWON, T. K.; PARK, J.; PARK, J.; BAEK, W.; SUH, M.; LEE, S. H.; BAEK, S.; LEE, I.; SUH, S. Catalase induces the expression of inducible nitric oxide synthase through activation of NF- $\kappa$ B and PI3K signaling pathway in Raw 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**, vol. 68, p. 2167–2176, 2004.

JANG, B.; PAIK, J.; KIM, S.; SHIN, D.; SONG, D.; PARK, J.; SUH, M.; PARK, J.; SUH, S. Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. **Cellular Signaling**, vol. 17, p. 625–633, 2005.

JANSSEN, W. J.; HENSON, P. M. Cellular Regulation of the Inflammatory Response. **Toxicology Pathology**, vol. 40, n. 11, p. 166-173, 2012.

JEGO, G.; HAZOUMÉ, A.; SEIGNEURIC, R.; GARRIDO, C. Targeting heat shock proteins in cancer. **Cancer Letters**, vol. 332, p. 275–285, 2013.

JIANG, F.; ZHANG, Y; DUSTING, G. J. NADPH Oxidase-mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacological Reviews**, vol. 63, p. 218–242, 2011.

JONES, R.; RUBIN, G.; BERENBAUM, F.; SCHEIMAN, J. gastrointestinal and cardiovascular risks of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American Journal of Medicine**, vol. 121, n. 6, p.464-474, 2008.

JOOSTEN, L. A. B.; HELSEN, M. M. A.; SAXNE, T.; VAN DE LOO, F. A. J.; HEINEGARD, D.; VAN DEN BERG, W. B. IL-1 $\alpha$  $\beta$  Blockade Prevents Cartilage and Bone Destruction in Murine Type II Collagen-Induced Arthritis, Whereas TNF- $\alpha$  Blockade Only Ameliorates Joint Inflammation. **Journal of Immunology**, vol. 163, p. 5049-5055, 1999.

JOSHI, G.; PERLUIGI, M.; SULTANA, R.; AGRIPPINO R.; CALABRESE, V. D.; BUTTERFIELD, A. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, vol. 48, p. 318–327, 2006.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, vol. 01, p. 244–257, 2013.

KANG, P.; KIM, K.Y.; LEE, H.S.; MIN, S.S.; SEOL, G.H. Anti-inflammatory effects of anethole in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Life Sciences**. vol. 93, p. 955–961, 2013.

KANTARCI, A.; VAN DYKE, T. E. Lipoxins in chronic inflammation. **Critical Review of Oral Biology Medicine**, vol. 14, n. 01, p. 04-12, 2003.

KEYEL, P. How is inflammation initiated? Individual influences of IL-1, IL-18 and HMGB1. **Cytokine**, vol. 69, p. 136–145, 2014.

KIKUZAKI, H.; HISAMOTO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol. 50, p. 2161-2168, 2002.

KIRCHHOFF, C.; JUNG, S.; REEH, P.W.; HANDWERKER, H.O. Carrageenan inflammation increases bradykinin sensitivity of rat cutaneous nociceptors.

**Neuroscience Letters**, vol. 111, p. 206-210, 1990.

KODYDKOVÁ, J.; VÁVROVÁ, L.; KOCÍK, M.; ŽÁK, A. Human Catalase, Its Polymorphisms, Regulation and Changes of Its Activity in Different Diseases. **Folia Biologica (Praha)**, vol. 60, p. 153-167, 2014.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews**, vol. 13, n. 03, p. 159-175, 2013.

KORKINA, L. G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. **Cellular and Molecular Biology**, vol. 53, n. 1, p. 15-25, 2007.

KORKINA, L.; KOSTYUK, V.; DE LUCA, C.; PASTORE, S. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, vol. 11, p. 823-835, 2011.

KOTHARI, N.; KESHARI, R. S.; BOGRA, J.; KOHLI, M.; ABBAS, H.; MALIK, A.; DIKSHIT, M.; BARTHWAL, M. K. Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis. **Journal of Critical Care**, vol. 26, p. 435-442, 2011.

KURKIN, V. A. Phenylpropanoids from medicinal plants: Distribution, classification, structural analysis, and biological activity. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 39, n. 2, 2003.

KVIETYS, P. R.; GRANGER, D. N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 52, p. 556–592, 2012.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J. E.; KANAGAWA, O.; ROSS, F. P.; TITELBAWM, S. L. TNF- $\alpha$  induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 106, n. 12, p. 1481-1488, 2000.

LANE, L.; WHITE, W. B.; ROSTOM, A.; HOCHBERG, M. COX-2 Selective Inhibitors in the Treatment of Osteoarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, vol. 38, p. 165-187, 2008.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 1, p. 01-10, 2009.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**. vol. 88, p. 85-94, 2007.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews**. Vol. 02, n. 10, p. 787-795, 2002.

LEE, S.H.; LEE, S.Y.; SON, D.J.; LEE, H.; YOO, H.S.; SONG, S.; OH, K.W.; HAN, D.C.; KWON, B.M.; HONG, J.T. Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 69, p. 791–799, 2009.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews**, vol. 09, n. 07, p. 678-689, 2007.

LI, C.; ZHOU, H. The Role of Manganese Superoxide Dismutase in Inflammation Defense. **Enzyme Research**, vol. 2011, p. 01-06, 2011.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WANG, H.; YANG, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**, vol. 06, p. 1-19, 2013.

LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, vol. 65, n. 12, p. S140–S146, 2007.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 37, n. 3, 2001.

LITTLE, J. W.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. **Amino Acids**, vol. 42, p.75–94, 2012.

LIZ, R.; VIGIL, S. V. G.; GOULART, S.; MORITZ, M. I. G.; SCHENKEL, E. P.; FRÖDE, T. S. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chilensis* Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 60, p. 515–521, 2008.

LUBOS, E.; KELLY, N. J.; OLDEBEKEN, S. R.; LEOPOLD, J. A.; ZHANG, Y.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione peroxidase-1 (GPX-1) deficiency augments proinflammatory cytokine-induced redox signaling and human endothelial cell activation. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 286, n. 41, p. 35407–35417, 2011.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R.; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**. Vol. 395, n. 02, p. 203–230, 2014.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: Pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 65, p. 185–195, 2014.

MARTIN, H. L.; TEISMANN, P. Glutathione—a review on its role and significance in Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, vol. 23, n. 10, p. 3263-3273, 2009.

MARTIN, S. W.; STEVENS, A. J.; BRENNAN, B. S.; DAVIES, D.; ROWLAND, M.; HOUSTON, J. B. The Six-Day-Old Rat Air Pouch Model of Inflammation: Characterization of the Inflammatory Response to Carrageenan. **Journal of Toxicological Methods**, vol. 32, n. 3, p. 139-147, 1994.

MATALON, S.; DAVIS, I. C.; JANG JR, J. D. Involvement of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in the Pathogenesis of Acute Lung Injury. **Mechanisms of Sepsis-Induced Organ Dysfunction and Recovery Update in Intensive Care and Emergency Medicine**. vol. 44, p. 97-111, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, n. 07, p. 428-435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**. Vol. 140, n. 3, p. 771-776, 2010.

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**, vol. 59, p. 2347–2352, 1999.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, vol. 15, p. 9252-9287, 2010.

MIN, S. S.; HAN, J. S.; KIM, Y. I.; NA, H. S.; YOON, Y. W.; HONG, S. K.; HAN, H. C. A novel method for convenient assessment of arthritic pain in voluntarily walking rats. **Neuroscience Letters**, vol. 308, p. 95-98, 2001.

MOLLACE, V. Modulation of Prostaglandin Biosynthesis by Nitric Oxide and Nitric Oxide Donors. **Pharmacological Reviews**, vol. 57, p. 217–252, 2005.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. **Cell Research**, vol. 21, p. 103-115, 2011.

MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, vol 68, n. 69, p. 165–175, 2002.

MOTTA, V.; SOARES, f.; SUN, T.; PHILPOTT, D. J. Nod-like receptors: versatile cytosolic sentinels. **Physiological Reviews**, vol. 95, p. 149–178, 2015.

MOUTET, M.; D'ALESSIO, P.; MALETTE, P.; DEVAUX, V.; CHAUDIÈRE, J. Glutathione Peroxidase Mimics Prevent Tnfa- And Neutrophil-Induced Endothelial Alterations. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 25, n. 3, p. 270–281, 1998.

MULLER, A.A.; REITER, S.A.; HEIDER, K.G.; WAGNER, H. Plan-derived acetophenones with antiasthmatic and antiinflammatory properties: inhibitory effects in chemotaxis, right angle scatter and actin polymerization of polymorphonuclear granulocytes. **Planta Medica**, v.65, n.7, 2001.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology**, vol. 3, n. 11, p. 01-02, 2012.

NAGASAKA, R.; CHOTIMARKORN, C.; SHAFIQUL, I.; HORI, M.; OZAKI, H.; USHIO, H. Anti-inflammatory effects of hydroxycinnamic acid derivatives. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 358, p. 615–619, 2007.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-

induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, vol. 128, p. 853-859, 1999.

NARUM, S.; WESTERGREN, T.; KLEMP, M. Corticosteroids and risk of gastrointestinal bleeding: a systematic review and meta-analysis. **BMJ Open**, vol. 04, n. 05, p. 01-09, 2014.

NATARAJAN, K.; SINGH, S.; BURKE, T.R.; GRUNBERGER, D.; AGGARWAL, B.B. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 93, p. 9090-9095, 1996.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, vol. 420, n. 12, p. 846-852, 2002.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, vol. 140, n. 03, p. 871–882, 2010.

NAZARÉ, A. C.; FARIA, C. M. Q. G.; CHIARI, B. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Ethyl ferulate, a component with anti-inflammatory properties for emulsion-based creams. **Molecules**, vol. 19, p. 8124-8139, 2014.

NENADIS, N.; ZHANG, H.; TSIMIDOU, M. Z. Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. **Jornal of Agriculture Food and Chemistry**. Vol. 51, p. 1874-1879, 2003.

NEUGEBAUER, V.; HAN, J. S; ADWANIKAR, H; FU, Y; JI, G. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. **Molecular Pain**, vol. 3, n. 8, 2007.

NEWTON, K.; DIXIT, V. M. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, vol. 04, n. 03, p. 01-19, 2012.

NEWTON, R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? **Thorax**, vol. 55, p. 603–613, 2000.

NGUYEN, T.; NIOI, P.; PICKETT, C. B. Oxidative stress signaling pathway and its activation by the Nrf2 - Antioxidant Response Element. **Journal of Biology and Chemistry**. Vol. 284, p. 13291-13295, 2009.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 47, p. 469–484, 2009.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 338, p. 668–676, 2005.

NYSTRÖ, L.; MÄKINEN, M.; LAMPI, A.; PIRONEN, V. Antioxidant activity of steryl ferulate extracts from rye and wheat bran. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol. 53, p. 2503-2510, 2005.

OHKAWA h, OHISHI N, YAGI K. Assay of lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, vol. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 61, n. 02, p. 255-265, 2011.

OU, S.; KWOK, K. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. vol. 84, p. 1261–1269, 2004.

PAIVA, L. B.; GOLDBECK, R.; SANTOS, W. D.; SQUINA, M. Ferulic acid and derivatives: molecules with potential application in the pharmaceutical field. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 49, n. 3, p. 395-411, 2013.

PARISE-FILHO, R.; PASTRELLO, M.; CAMERLINGO, C.E.P.; SILVA, G.J.; AGOSTINHO, L.A.; DE SOUZA, T.; MAGRI, F.M.M.; RIBEIRO, R.R.; BRANDT, C.A.; POLLI, M.C. The anti-inflammatory activity of dillapiole and some semisynthetic analogues. **Pharmaceutical Biology**, vol. 49, p. 1173–1179, 2011.

PASPARAKIS, M. Regulation of tissue homeostasis by NF- $\kappa$ B signalling: implications for inflammatory diseases. **Nature Reviews**, vol. 09, p. 778-788, 2009.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, vol. 59, p. 285–289, 2009.

PERLUIGI, M.; JOSHI, G.; SULTANA, R.; CALABRESE, V.; DE MARCO, C.; COCCIA, R.; CINI, C.; BUTTERFIELD, A. In Vivo Protective Effects of Ferulic Acid Ethyl Ester Against Amyloid-Beta Peptide 1–42-induced Oxidative Stress. **Journal of Neuroscience Research**, vol. 84, p. 418–426, 2006.

PERRONE, M. G.; SCILIMATI, A.; SIMONE, L.; VITALE, P. Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be reconsidered. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 17, p. 3769-3805, 2010.

PULLI, B.; ALI, M.; FORGHANI, R.; SCHOB, S.; HSIEH, K. L. C.; WOJTKIEWICZ, G.; LINNOILA, J. J.; CHEN, J. W. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PLoS ONE**, vol. 8, n. 07, p. 01-10, 2013.

RADI, Z. A.; KHAN, N. K. Effects of cyclooxygenase inhibition on the gastrointestinal. **Experimental and Toxicologic Pathology**, vol. 58, p. 163–173, 2006.

RAMPRASATHA, V. R.; SHANTHID, P.; SACHDANANDAMA, P. Evaluation of antioxidant effect of *Semecarpus anacardium* Linn. nut extract on the components of immune system in adjuvant arthritis. **Vascular Pharmacology**, vol. 42, p. 179–186, 2005.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, vol. 39, p. 603–613, 2001.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, vol. 62, p.250–264, 2014.

RAYHANA, B.; SHELIYA, M. A.; PILLAI, K.K.; AERI, V.; SHARMA, M. Evaluation of Anti-inflammatory Effect of *Careya arborea* in CFA Induced Chronic Inflammation. **Int. Journal of Pharmaceutical Sciences Reviews and Research.**, vol. 26, n. 02, p. 292-298, 2014.

RAZZAGHI-ASL, N.; GARRIDO, J.; KHAZRAEI, H.; BORGES, F.; FIRUZI, O. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. **Current Medicinal Chemistry**, vol. 20, p. 4436-4450, 2013.

RECZEK, C. R.; CHANDEL, N. S. ROS-dependent signal transduction. **Current Opinion in Cell Biology**, vol. 33, p. 8–13, 2015.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids - New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**, vol. 353, n. 16, p. 1711-1723, 2005.

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

RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Leads: Past Successes and Present Day Issues. **The American Journal of Cardiology**, vol. 101, p.43-49, 2008.

RITTER, A.M.V.; DOMICIANO, T.P.; VERRI, W.A.J.; ZARPELON, A.C.; DA SILVA, L.G.; BARBOSA, C.P.; NATALI, M.R.M.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Antihypernociceptive activity of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, vol. 21, p. 187–197, 2013.

RITTNER, H. L.; MACHELSKA, H.; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 78, n. 12, p. 1215-1222, 2005.

ROBERTS, R. A.; SMITH, R. A.; SAFE, S.; SZABO, C; TJALKENS, R. B.; ROBERTSON, F. M. Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, vol. 276, p. 85–94, 2010.

ROMITELLI, F; SANTINI, A. S; CHIERICA, E; PITOCCO, D et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC–MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. **Journal of Chromatography B**, vol. 851, p. 257-267, 2007.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M.N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; FROMENTIN, G.; DURAND, P.; TOMÉ, D.; PROST, M.; BERSET, C. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol. 52, p. 4338–4343, 2004.

SÁ, R. C. S, ANDRADE, L. N, OLIVEIRA, R. R. B., SOUSA, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules**, vol. 19, p. 1459-1480, 2014.

SABIHA, S.; AHMAD, M. A.; MOHD, A.; MOHD, A. Role of phenolic compounds in peptic ulcer: An overview. **Journal of Pharmaceutical Bioallied Sciences**. vol. 03, n. 03, p. 361–367, 2011.

SAEED, S.A.; SIMJEE, R.U.; SHAMIM, G.; GLLANI, A.H. Eugenol: A dual inhibitor of platelet-activating factor and arachidonic acid metabolism. **Phytomedicine**, vol. 02, p. 23–28, 1995.

SAHPAZ, M.; GARBACKI, N.; TITS, M.; BAILLEUL, F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from Marrubium Vulgare. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 79, p. 389–392, 2002.

SALVEMINI, D. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, vol. 118, p. 829-838, 1996.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; BOURDON, D. M.; STERN, M. K.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. **European Journal of Pharmacology**, vol. 303, p. 217-220, 1996.

SALVEMINI, D; LITTLE, J W.; DOYLE, T; NEUMANN, W. L. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology & Medicine**, vol. 51, p. 951–966, 2011.

SAN MIGUEL, S. M.; OPPERMAN, L. A.; ALLEN, E. P.; ZIELINSKI, J.; SVODOBA, K. K. H. Bioactive polyphenol antioxidants protect oral fibroblasts from ROS-inducing agents. **Archives of Oral Biology**, vol. 57, p. 1657-1667, 2012.

SCANZELLO, C. R.; GOLDRING, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. **Bone**, vol. 51, p. 249–257, 2012.

SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, A.; COLOMBRITA, CI.; SULTANA, R.; PASCALE, A.; CALABRESE, V. Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 6, n. 5, p, 811-818, 2004.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and review oxidative stress. **Current Biology**, vol. 24, n. 05, p. R453–R462, 2014.

SCOTT, A.; KHAN, J. M.; COOK, J. L.; DURONIO, V. What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? **British Journal of Sports and Medicine**. vol. 38, p. 38: 248-249, 2004.

SELYE, H. Use of "granuloma pouch" technic in the study of antiphlogistic corticoids. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, vol. 82, p. 328-333, 1953.

SERHAN, C. N; BRAIN, S. D; BUCKLEY, C. D; GILROY, C. H; O'NEILL, M. P et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FAESB Journal**. vol. 21, n. 02, p. 325-332, 2007.

SHAH, B. N; SETH, A. K; MAHESHWARI, K. M. A review on medicinal plants as a source of anti-inflammatory agents. **Research Journal of Medicinal Plant**. vol. 05, n. 02, p. 101-115, 2011.

SHIN, K.; KIM, I.; PARK, Y.; HAB, J.; CHOIC, J.; PARK, H.; LEE, Y. S.; LEE, K. 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**, vol. 68, p. 2327–2336, 2004.

SIMON, L. S. Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. **The American Journal of Medicine**. vol. 106, n. 5B, p. 37S-42S, 1999.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews**. vol. 10, n. 06, p. 427-439, 2010.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Caffeic Acid Amide and Ester Analogues: Structure-Activity Relationship. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**. vol. 50, p. 468-472, 2002.

SONG, Y.S.; PARK, E.H.; HUR, G.M.; RYU, Y.S.; LEE, Y.S.; LEE, J.Y.; KIM, Y.M.; JIN, C. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Cancer Letters**; vol. 175, p. 53-61, 2002

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, vol. 24, p. 121–132, 2010.

SOUSA, D. P. Analgesic-like Activity of Essential Oils Constituents. **Molecules**, vol. 16, p. 2233-2252, 2011.

SULTANA, R. Ferulic acid ethyl ester as a potential therapy in neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1822, p. 748–752, 2012.

SULTANA, R.; RAVAGNA, A.; MOHMMAD-ABDUL, H.; CALABRESE, V.; BUTTERFIELD, D. A. Ferulic acid ethyl ester protects neurons against amyloid  $\beta$ peptide(1–42)-induced oxidative stress and neurotoxicity:relationship to antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, vol. 92, p. 749–758, 2005.

SUN, J.; ZHANG, X.; BRODERICK, M.; FEIN, H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. **Sensors**, vol. 03, p. 276-284, 2003.

SURH, Y. NF- $\kappa$ B and Nrf2 as potential chemopreventive targets of some anti-inflammatory and antioxidative phytonutrients with anti-inflammatory and antioxidative activities. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, vol. 17, n. S1, p. 269-272, 2008.

TAKAHARA, S; HAMILTON, B. H; NELL, J. V; OGURA, Y; NISHIMURA, E. T. Hypocatalasemia, a new genetic carrier states. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 29, p. 610–619, 1960.

TALWAR, S.; NANDAKUMAR, K.; NAYAK, P. G.; BANSAL, P.; MUDGAL, J.; MOR, V.; RAO, C. M.; LOBO, R. Anti-inflammatory activity of Terminalia paniculata bark extract against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 134, p. 323–328, 2011.

TAMURA, Y.; TORIGOE, T.; KUTOMI, G.; HIRATA, K.; SATO, N. New paradigm for intrinsic function of heat shock proteins as endogenous ligands in inflammation and innate immunity. **Current Molecular Medicine**, vol. 12, p. 1198-1206, 2012.

TEIXEIRA, J.; GASPAR, A.; GARRIDO, M.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. **Biomed Research International**. vol, 2013, n. 07, p. 01-11, 2013.

TEKEUCHI, O.; AKIRA, S.; Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, vol. 140, n. 03, p. 805–820, 2010.

TKÁČOVÁ, J.; ANGELOVIČOVÁ, M. Heat Shock Proteins (HSPs): a Review. **Animal Science and Biotechnologies**, vol. 45, n. 01, p. 349-353, 2012.

TOGNOLINI, M.; BALLABENI, V.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; IMPICCIATORI, M.; BAROCCELLI, E. Protective effect of Foeniculum vulgare essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. **Pharmacological Research**, vol. 56, p. 254–260, 2007.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal of Pharmacology**, vol. 251, p. 173 – 179, 1994.

TONUSSI, C. R.; FERREIRA, S. H. Tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates carrageenin-induced knee-joint incapacitation and also triggers overt nociception in previously inflamed rat knee-joints. **Pain**, vol 82, p. 81–87, 1999.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, vol. 420, n. 12, p. 853-859, 2002.

TRACY, R. P. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor . . and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **Journal of Gerontology**. vol. 61A, n. 10, p. 1051–1052, 2006.

TUA, Y.; CHENG, S.; SUN, H.; MA, T.; ZHANG, S. Ferulic acid potentiates pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. **Neuroscience Letters**, vol. 525, p. 95–99, 2012.

TUREK, C.; STINTZING, F. C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, vol. 12, p. 40-53, 2012.

VALE, M.L.; CUNHA, F.Q.; BRITO, G.A.C; BENEVIDES, V.M.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; RIBEIRO, R.A. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. **European Journal of Pharmacology**, v. 536, p.309–317, 2006.

VAN SCHOOR, J. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal risk. Part 2. **South African Pharmacology Journal**, vol. 81, n. 02, p. 10-13, 2014.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, vol. 03, n 1, p. 2–20, 2010.

VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Adverse effects and their prevention. **Seminar in Arthritis and Rheumatism**s, vol. 39, p. 294-312, 2010.

VYSAKH, A.; RATHEESH, M.; RAJMOHANAN, T. P.; PRAMOD, C.; PREMLAL, S.; KUMAR, B. G.; SIBI, P. I. Polyphenolics isolated from virgin coconut oil inhibits adjuvant induced arthritis in rats through antioxidant and anti-inflammatory action. **International Immunopharmacology**, vol. 20, p. 124–130, 2014.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet**, vol. 371, n. 01, p. 270–73, 2008.

WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 103, n. 03, p. S378-S371, 1999.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **The Lancet**, vol. 355, n. 02, p. 646–48, 2000.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A. R.; COLVILLE-NASH, P. R.; GILROY, D. Resolution of inflammation. **International Journal of Immunopharmacology**, vol. 22, p. 1131–1135, 2000.

WINTER, C.A, RISLEY, E.A, NUSS, G.W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**. v.111, p. 544-551, 1962.

WOODRUFF, T. M; STRACHAN, A. J; DRYBURGH, N.; SHIELS, I. A; REID, R. C; FAIRLIE, D. P; TAYLOR, S. M. Antiarthritic activity of an orally active c5a receptor antagonist against antigen-induced monarticular arthritis in the rat. **Arthritis & rheumatism**, vol. 46, n. 9, p. 2476–2485, 2002.

WULLAERT, A.; BONNET, M. C.; PASPAKARIS, M. NF- $\kappa$ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. **Cell Research**, vol. 21, p.146-158, 2011.

WYNN, t. a.; CHAWLA, A.; POLLARD, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature Reviews**, vol, 496, n. 04, p. 445-455, 2013.

YADAV, U. C. S.; ROMANA, K. V. Regulation of NF- $\kappa$ B-induced inflammatory signaling by lipid peroxidation-derived aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2013, p. 1-11, 2013.

YAMADA, T.; DEITCH, E.; SPECIAN, R. D.; PERRY, M. A.; SARTOR, R. B.; GRISHAM, M. B. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. **Inflammation**, vol. 17, n. 06, p. 641-662, 1993.

YASUI, K.; BABA, A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. **Inflammation Research**. vol. 55, p. 359–363, 2006.

YIN, L.; YANG, Y.; WANG, M.; ZHANG, M.; DUAN, J. Effects of syringin from *Phellodendron chinensis* on monosodium urate crystal-induced inflammation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 6, n. 21, p. 1515-1519, 2012.

YOSHIKAWA, T.; TANAKA, H.; KONDO, M. The increase of lipid peroxidation in rat adjuvant arthritis and its inhibition by superoxide dismutase. **Biochemical Medicine**, vol. 33, p. 320-326, 1985.

YU, Y. C.; KOO, S. T.; KIM, C. H.; LYU, Y.; GRADY, J. J.; CHUNG, J. M. Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. **Journal of Neuroscience Methods**, vol. 115, p. 107-113, 2002.

YU, Y.; XIONG, Z.; LV, Y.; QIAN, Y.; JIANG, S.; TIAN, Y. In vivo evaluation of early disease progression by X-ray phase-contrast imaging in the adjuvant-induced arthritic rat. **Skeletal Radiology**, vol. 35, p. 156–164, 2006.

YUAN, G.; WAHLQVIST, M. L.; HE, G.; YANG, M.; LI, D. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, vol. 15, n. 2, p. 143-152, 2006.

ZARRAGA, I. G. E.; SCHWARS. Coxibs and heart disease: What we have learned and what else we need to know. **Journal of the American College of Cardiology**, vol. 49, n. 01, p. 01-14, 2007.

ZENI, A. L. B.; ZOWKOWSKI, A. D. E.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A. L. S.; TASCIA, C. I. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: Evidence for the involvement of the serotonergic system. **European Journal of Pharmacology**, vol. 679, p. 68–74, 2012.

ZHANG, L.; AL-SUWAYEH, S. A.; HSIEHC, P.; FANG, J. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: Evaluation of their efficacy and safety. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 399, p. 44–51, 2010.

ZHAO, Z.; EGASHIRA, Y.; SANADA, H. Ferulic acid is quickly absorbed from rat stomach as the free form and then conjugated mainly in liver. **Journal of Nutrition**. vol. 134, p. 3083–3088, 2004.

# Apêndice



## Ferulic acid ethyl ester diminished Complete Freund's Adjuvant-induced incapacitation through antioxidant and anti-inflammatory activity

Francisco Valmor Macedo Cunha<sup>1</sup> · Bruno de Sousa Gomes<sup>1</sup> · Benedito de Sousa Neto<sup>1</sup> · Alana Rodrigues Ferreira<sup>2</sup> · Damiano Pergentino de Sousa<sup>2</sup> · Maria do Carmo de Carvalho e Martins<sup>3</sup> · Francisco de Assis Oliveira<sup>1</sup>

Received: 11 April 2015 / Accepted: 1 October 2015 / Published online: 24 October 2015  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

**Abstract** Ferulic acid ethyl ester (FAEE) is a derivate from ferulic acid which reportedly has antioxidant effect; however, its role on inflammation was unknown. In this study, we investigated the orally administered FAEE anti-inflammatory activity on experimental inflammation models and Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats. CFA-induced arthritis has been evaluated by incapacitation model and radiographic knee joint records at different observation time. FAEE (*po*) reduced carrageenan-induced paw edema ( $p < 0.001$ ) within the 1st to 5th hours at 50 and 100 mg/kg doses. FAEE 50 and 100 mg/kg, *po* inhibited leukocyte migration into air pouch model ( $p < 0.001$ ), and myeloperoxidase, superoxide dismutase, and catalase activities ( $p < 0.001$ ) increased total thiol concentration and decreased the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  concentrations, NO, and thiobarbituric acid reactive species. In the CFA-induced arthritis, FAEE 50 and 100 mg/kg significantly reduced the edema and the elevation paw time, a joint disability parameter, since second hour after arthritis induction ( $p < 0.001$ ). FAEE presented rat joint protective activity in radiographic records ( $p < 0.001$ ). The data suggest that the FAEE exerts anti-inflammatory

activity by inhibiting leukocyte migration, oxidative stress reduction, and pro-inflammatory cytokines.

**Keywords** Ferulic acid ethyl ester · Phenylpropanoid · Anti-inflammatory activity · Arthritis · Complete Freund's Adjuvant

### Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory, autoimmune disease with a 0.5–1.0 % prevalence around the world. It is associated with joint destruction, pain and impaired movement, progressive disability, systemic complications, high socioeconomic costs, and early death (McInnes and Schett 2011). Notably, arthritic joints have polymorphonuclear cell infiltration that release cytokines, mainly tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), metalloproteinase, and free radicals that together are responsible for cartilage and bone damage (Dinarello 2007; Salvemini et al. 2011; Brieger et al. 2012).

Current anti-inflammatory therapy comprises the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), corticosteroids, disease-modifying antirheumatic agents, and monoclonal antibodies (Aaltonen et al. 2012). However, these drugs are associated with gastrointestinal or cardiovascular side effects and either are expensive (Ashley et al. 2012). Thereby, it is necessary to find new drugs for RA treatment and other chronic diseases such as lupus and Crohn's disease.

Severous natural compounds extracted from plants and essential oils have been used for inflammatory condition treatment (Sousa 2011). Essential oils are natural origin volatile constituent mixtures, which have anti-inflammatory and antioxidant activity (Turek and Stintzing 2012). Essential oils

✉ Francisco Valmor Macedo Cunha  
oefourjeunido@yahoo.com.br

<sup>1</sup> Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, Avenida Nossa Senhora de Fátima s/n, 64049-550 Teresina, PI, Brazil

<sup>2</sup> Pharmaceutical Sciences Department, Federal University of Paraíba, Jardim Universitário, 58051-970 João Pessoa, PB, Brazil

<sup>3</sup> Physiology and Biophysics Department, Federal University of Piauí, Avenida Nossa Senhora de Fátima s/n, 64049-550 Teresina, PI, Brazil