



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Determinação da atividade anti-inflamatória de
extratos metanólicos de *Pterospartum
tridentatum*
Experiência Profissionalizante na Vertente
de Farmácia Comunitária e Investigação**

Joana Carolina Vicente Fernandes

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Duarte
Co-orientadora: Dr.^a Anabela Rodrigues

Covilhã, Junho de 2012

Dedicatória

Aos meus Pais e Irmão, pelo constante apoio e incentivo, por acreditarem sempre nos meus sonhos e ambições e nunca me deixarem desistir.

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho contei com o contributo de várias pessoas às quais gostaria de deixar um sincero agradecimento.

Em primeiro lugar agradeço à minha família, por serem o meu porto seguro, em especial ao meu Irmão, e aos meus Pais, pelo apoio incondicional, por tudo o que abdicaram para que pudesse chegar até aqui e por me terem ensinado desde pequena os valores que hoje definem aquilo que sou.

Agradeço também aos meus Amigos e ao Williams, por todos os momentos que passámos juntos e por estarem sempre presentes na minha vida e me ajudarem a ultrapassar mais uma etapa da minha vida.

Ao Ângelo Luís, por toda a paciência, disponibilidade e incansável ajuda que me deu durante a realização do trabalho experimental, e à Ana Oliveira por ter sido o meu braço direito.

Um profundo agradecimento à Professora Doutora Ana Paula Duarte, pelo exemplo que é para mim e por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver este trabalho, pela valiosa orientação científica, incentivo e disponibilidade.

Agradeço em especial à Dr.^a Anabela Rodrigues a possibilidade de realização do estágio na sua farmácia e à Dr.^a Cátia Pereira, por toda a disponibilidade, profissionalismo, entusiasmo e conhecimentos transmitidos que irão permitir que esta experiência profissional se projete no meu futuro como elo fundamental na minha formação profissional e pessoal.

Agradeço ainda à restante equipa técnica da Farmácia Avenida, com gratidão e carinho, todo o empenho, dedicação, paciência e o ambiente agradável que sempre manifestaram durante todo o meu período de estágio.

Quero ainda expressar à UBI e à FCS, o meu reconhecimento pela formação durante 5 anos e gratidão a todos os professores que através dos seus ensinamentos contribuíram para a construção dos alicerces a partir dos quais construirei o meu futuro.

Resumo

O presente relatório de estágio é constituído por duas partes, sendo a Parte I referente à investigação experimental, e a Parte II relativa ao estágio desenvolvido ao nível da farmácia comunitária.

O principal objetivo da Parte I é avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de diferentes partes da planta *Pterospartum tridentatum*, nomeadamente dos caules, folhas e flores. Os extratos brutos foram obtidos por extração com soxhlet e avaliados quanto à atividade anti-inflamatória. Esta atividade foi avaliada através do método que verifica a eventual ação inibitória dos extratos sobre a enzima 5-lipoxigenase e consequente inibição da formação de 5-HETE (ácido 5-hidroxicosatotetraenóico), sendo esta reação seguida espectrofotometricamente a 234 nm. Esta reação foi também seguida através de um ensaio colorimétrico a 620 nm (ensaio FOX), que pretende avaliar a atividade enzimática da enzima 5-lipoxigenase por formação de um complexo entre Fe^{3+} e o laranja xilenol que absorve na região do visível, mimetizando a hidroperoxidação lipídica que ocorre no organismo durante o processo inflamatório. Para este efeito estas metodologias foram implementadas em laboratório.

A Parte II tem como principal objetivo abordar sucintamente as etapas da minha formação ao nível do funcionamento da farmácia comunitária, bem como o papel do farmacêutico enquanto diretor técnico e como farmacêutico adjunto, enquanto profissional de saúde especialista do medicamento e agente de saúde pública.

Palavras-chave

5-lipoxigenase; inflamação; atividade anti-inflamatória; *Pterospartum tridentatum*; flavonóides; ensaio espectrofotométrico; ensaio FOX; farmácia comunitária

Abstract

This report consists of two parts, Part I concerning the experimental investigation, and Part II on the stage developed in community pharmacy.

The main purpose of Part I was to evaluate the anti-inflammatory activity of methanolic extracts from different parts of the shrub *Pterospartum tridentatum*, particularly the extracts of the stems, leaves and flowers. The crude extracts were obtained by soxhlet extraction and the anti-inflammatory activity was evaluated. This activity was evaluated using the method that verifies the potential inhibition of 5-lipoxygenase enzyme to create 5-HETE by the extracts and the reaction was followed by spectrophotometry at 234 nm. A colorimetric assay was also carried out (FOX assay) to evaluate the enzymatic activity of 5-lipoxygenase enzyme by forming a complex between Fe^{3+} and orange xylenol which absorbs in the visible region, mimicking the lipid hydroperoxidation that occurs during the inflammatory process. For this purpose, these methods were implemented in the laboratory.

Part II aims to describe the stages of my formation in community pharmacy, as well as the role of the pharmacist as technical director and as assistant pharmacist, and as a specialist and public health worker.

Keywords

5-Lipoxygenase; inflammation; anti-inflammatory activity; *Pterospartum tridentatum*; flavonoids; spectrophotometric assay; FOX assay; community pharmacy

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice	xi
Parte I - Investigação Experimental - Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de <i>Pterospartum tridentatum</i>	3
1. Introdução.....	3
1.1. Inflamação.....	3
1.2. Inibição da Lipoxigenase (LOX).....	7
1.3. Anti-inflamatórios	10
1.4. Produtos naturais com atividade anti-inflamatória	11
1.4.1. Flavonóides	12
1.4.2. Carqueja - <i>Pterospartum tridentatum</i>	18
1.5. Determinação da atividade anti-inflamatória.....	20
2. Material e Métodos	23
2.1. Matéria vegetal.....	23
2.2. Reagentes químicos	23
2.3. Equipamentos	23
2.4. Preparação das amostras	23
2.5. Ensaio Espectrofotométrico	24
2.6. Ensaio FOX.....	24
3. Resultados e Discussão	27
3.1. Ensaio Espectrofotométrico	27
3.2. Ensaio FOX.....	29
4. Conclusões	33
Referências Bibliográficas - Parte I	35
Anexos - Parte I.....	39
Parte II - Estágio em Farmácia Comunitária	43
Introdução.....	43
Organização da Farmácia	45
Informação e Documentação Científica.....	49
Medicamentos e Outros Produtos de Saúde	50
Aprovisionamento e Armazenamento.....	52

Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento.....	54
Dispensa de Medicamentos	55
Automedicação.....	58
Aconselhamento e Dispensa de Outros Produtos de Saúde	60
Outros Cuidados de Saúde Prestados na Farmácia	63
Preparação de Medicamentos.....	71
Contabilidade e Gestão	74
Conclusões	77
Referências Bibliográficas - Parte II	79
Anexos - Parte II.....	83

***“A essência do conhecimento
consiste em aplica-lo
uma vez possuído!”***
Confúcio

Parte I - Investigação Experimental - Determinação da atividade anti-inflamatória de extratos metanólicos de *Pterospartum tridentatum*

1. Introdução

1.1. Inflamação

A inflamação define-se clinicamente como um processo fisiopatológico resultante da reação do tecido vascularizado a um dano num determinado local. Geralmente resulta da resposta imune a um microrganismo infeccioso, podendo também dever-se a traumas, cirurgias, químicos cáusticos, temperaturas extremas ou isquémia em tecidos do organismo.[1-2]

Os mecanismos de inflamação envolvem cascatas complexas de eventos cujas respostas são iniciadas e reguladas por uma variedade de diferentes mediadores libertados por diversos tipos de células [2], aos quais estão atribuídas determinadas respostas inflamatórias, como se pode observar na tabela 1.

Tabela 1. Sinais da inflamação e respetivos mediadores químicos [1]

Resposta Inflamatória	Mediador Químico
Inchaço, vermelhidão e calor do tecido (vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar)	Histamina, prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina, fator de ativação plaquetar
Danos tecidulares	Enzimas lisossomais e produtos libertados por neutrófilos, macrófagos e outras células inflamatórias
Quimiotaxia	Fragmentos do complemento
Dor	Prostaglandinas
	Bradicinina
Febre	Interleucina-1 e interleucina-6
Leucócitos	Fator de necrose tumoral e interleucina-8

A inflamação pode apresentar-se de duas formas: **aguda** ou **crónica**.

A **inflamação aguda** resulta de uma resposta complexa, essencial e imediata a uma lesão. Não é específica e geralmente ocorre antes da resposta imunitária se estabelecer tendo assim como objetivo a remoção do agente infeccioso, limitando a extensão do dano tecidular.[1] Aurelius Cornelius (50 a.C. - 45 d.C.), médico e escritor romano, definiu que a

reação local poderia ser caracterizada em latim por *Rubor, Tumor, Calor, Dolor e Functio laesa*, i.e., vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda de função.[3] A manifestação da resposta inflamatória aguda pode ser atribuída a alterações vasculares imediatas (vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar), ao influxo de células inflamatórias como os neutrófilos e, em alguns casos, a efeitos sistêmicos provocados por mediadores químicos produzidos no local da inflamação entrando posteriormente na circulação sistêmica.[1]

Os mediadores inflamatórios responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular são: óxido nítrico (NO), histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetar e substância P. Estes são responsáveis pela adesão e transmigração endotelial de leucócitos (ex. neutrófilos granulócitos) até ao local da infecção tecidual. A extravasação de neutrófilos é coordenada por moléculas de adesão (molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e molécula de adesão vascular celular 1 (VCAM-1)), quimiocinas (ex. IL-8) e metabolitos gerados pela via do ácido araquidónico (AA).[4]

O AA (precursor de eicosanóides) é um ácido gordo polinsaturado libertado maioritariamente pela membrana lipídica das células, sendo a enzima responsável por esta libertação a fosfolipase A₂, apesar de também poder estar envolvida a fosfolipase C e a diacilglicerose lípase, quando estimulada por diversos fatores associados à inflamação. [5-6] Assim na via do ácido araquidónico a fosfolipase A₂ (PLA₂) fornece AA como substrato para a cicloxigenase (COX) e para a lipoxigenase (LOX) que por sua vez originam diferentes eicosanóides, como as prostaglandinas e leucotrienos, respetivamente, desencadeando quimiotaxia e vasodilatação.[4, 6]

Ao nível da inflamação aguda, na via da LOX a LTA₄ hidrolase assume particular importância levando à formação de um potente leucotrieno B₄ (LTB₄) atrator de neutrófilos e eosinófilos, estando envolvido na patogénese de diversas doenças inflamatórias humanas.[4, 7]

Como o tempo de meia vida dos mediadores inflamatórios e neutrófilos envolvidos na inflamação aguda é curto e como ocorre libertação de citocinas anti-inflamatórias (ex.: fator transformador de crescimento β e IL-10) e mediadores (ex.: lipoxinas, resolvinas, e protectinas), este tipo de inflamação é limitado e de curta duração.[4]

A **inflamação crónica**, por outro lado, prolonga-se no tempo podendo durar semanas a meses e é causada por infeções persistentes, doenças inflamatórias imuno-mediadas ou exposição prolongada a reagentes tóxicos. Caracteriza-se pela infiltração de células mononucleares (macrófagos) e linfócitos, que possuem um tempo de vida de meses a anos e são responsáveis pela destruição severa dos tecidos, em vez do influxo de neutrófilos observado nas inflamações agudas, bem como pela proliferação de fibroblastos, em vez da formação de exsudatos. Neste tipo de inflamação há assim um risco aumentado para formação de cicatrizes.[1, 4]

Os macrófagos diferem dos monócitos não só no tempo de meia vida, mas também no processo de travessia do endotélio, o qual no caso dos macrófagos é determinado por moléculas de adesão (ex.: ICAM-1 e VCAM-1) e por quimiocinas (ex.: proteína quimioatratadora de monócitos-1 (MCP-1) e proteína inflamatória de macrófagos-1(MIP-1)). Existe uma interação positiva bidirecional entre linfócitos e macrófagos que envolve diversas citocinas (ex.: IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF- α), IL1- β e IL-12) e quimiocinas (ex.: IL-8, MCP-1 e MIP-1), resultando assim numa resposta inflamatória prolongada.[4]

O grau de inflamação pode ser determinado pelo balanço entre a regulação/desregulação e a inter-relação entre os mediadores inflamatórios chave. Por exemplo, citocinas como o TNF- α e a IL-1 β são essenciais para o início da resposta inflamatória, por se ligarem aos seus recetores e ativarem o NF κ B por diversas vias, controlando assim a indução de vários genes inflamatórios.[4]

Na figura 1 estão representadas as principais vias inflamatórias presentes nas células humanas.

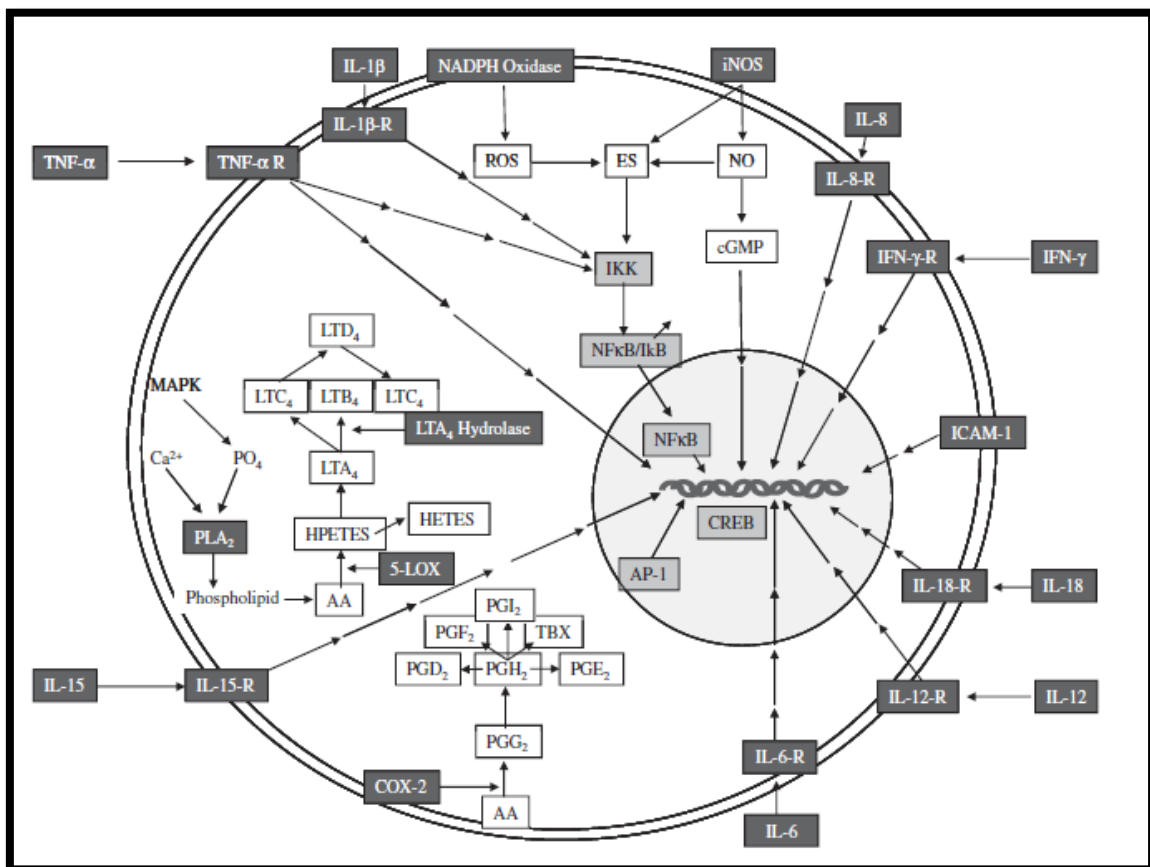


Figura 1. Vias inflamatórias em células humanas. Representação da rede de mediadores-chave para a inflamação. Os efectores inflamatórios e os recetores estão representados nas caixas negras, fatores de transcrição e cofatores nas caixas cinzentas, ou outros mediadores nas caixas brancas. De uma forma resumida, a transmigração de leucócitos através do local de infeção tecidual é desencadeada pelo ICAM-1 e IL-8. A PLA₂ cliva o AA dos fosfolípidos como substrato para a COX-2 e 5-LOX. A conversão de AA em prostaglandinas e tromboxanos (COX-2) e leucotrienos (5-LOX) induz quimiotaxia, vasodilatação e febre. A LTA₄ hidrolase gera um potente quimioatratador: LTB₄. O TNF- α e a IL-1 β são críticos no início da

resposta inflamatória por ligação aos respetivos recetores e indução da febre, vasodilatação e estimulação dos linfócitos-T ou apoptose. A expressão de genes inflamatórios é desencadeada pelo NF- κ B (locais de ligação em promotores de PLA₂, COX-2, 2-LOX, iNOS, ICAM-1, IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- β e GM-CSF) e AP-1 (locais de ligação em promotores de COX-2, iNOS, ICAM-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8). O CREB tem um papel principal como coativador transcricional do NF- κ B e AP-1. O IFN- γ ativa o NF- κ B e induz a ativação de macrófagos e apoptose mas também tem propriedade anti-inflamatórias (induz a expressão de antagonistas dos recetores de IL-1, desregula a IL-1 e IL-8). A geração de ES pró-inflamatórias é mediada pela NADPH oxidase (ex.: O₂⁻) e iNOS (ex.: NO). As outras ILs têm funções pleiotrópicas como a indução de febre, estimulação de linfócitos-T, desregulação do TNF- α e IL-1 β (IL-6), indução e libertação de IFN- γ , regulação das células T (H1) (IL-12), ativação das células T e macrófagos, sinalização STAT, indução de TNF- α e IL-1 β (IL-15), e expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, e IL-8 (IL-18). Abreviaturas: 5-LOX (5-lipoxigenase), AA (ácido araquidónico), AP-1 (ativador de proteína-1), COX-2 (ciclo-oxigenase-2), CREB (elemento responsável pela ligação a proteínas- cAMP), ES (espécies electrofílicas), HPETES (ácidos hidroperoxieicosatetraenóico), HETES (ácidos hidroieicosatetraenóico), ICAM-1 (molécula de adesão intracelular-1), iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), κ B (subunidade inibitória do NF κ B), IKK (I κ B cinase), LT (leucotrieno), MAPK (proteína cinase ativadora do mitógeno), NF κ B (fator nuclear κ B), NO (óxido nítrico), PLA₂ (fosfolipase A₂), PGs (prostaglandinas), ROS (espécies reativas ao oxigénio), TBX (tromboxanos), TNF- α (fator de necrose tumoral - α) e TNF- α R (recetor de TNF- α). [4]

Para além da via de inflamação dependente de AA, existe ainda uma via independente de AA na qual estão incluídas proteínas como NOS, NF- κ B, PPAR e NAG-1.[3] Uma vez que são produzidas e reguladas várias citocinas inflamatórias a nível transcricional, pode ocorrer aumento ou inibição do processo inflamatório.[3] Um dos elos de ligação entre os fatores de transcrição e as citocinas pró-inflamatórias é o recetor ativado por proliferador de peroxissomas (PPAR), que consiste num recetor nuclear de hormonas que são ativadas por ligandos específicos endógenos e exógenos. A sua ativação é responsável pelos efeitos pleiotrópicos dos proliferadores de peroxissomas, como a indução enzimática, a proliferação de peroxissomas e o efeito anti-inflamatório.[3] O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso sintetizado bioquimicamente a partir da L-arginina por enzimas NOS (NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzível) constituindo um mediador inflamatório, pelo que a sua inibição tem sido cada vez mais estudada.[3, 5] O NF- κ B é um fator ubiquitário presente no citoplasma celular, e quando ativado por exemplo por radicais livres, estímulo inflamatório ou endotoxinas, é translocado para o núcleo onde induz a expressão de genes que suprimem a apoptose e induzem a transformação celular, proliferação, invasão, metástase, quimio-resistência, radio-resistência e inflamação.[3] A indução do NAG-1 por AINEs constitui um importante mecanismo independente da COX e a diversidade de funções biológicas representadas pela sua nomenclatura sugerem que esta proteína tem uma atividade alargada ao nível da inflamação, cancro e diferenciação.[3]

1.2. Inibição da Lipoxigenase (LOX)

As lipoxigenases são as enzimas responsáveis pela produção de hidroxiácidos e leucotrienos (LTs) a partir do ácido araquidônico (AA). [3, 5]

Dependendo do ponto de inserção da molécula de oxigênio no AA, as isoenzimas LOX dos mamíferos podem ser classificadas em cinco grupos: 5-, 8-, 11-, 12- e 15-LOX que afetam diferentes células/tecidos.[8]

Como se pode verificar na figura 2 a 15-LOX sintetiza os anti-inflamatórios 15-HETE (ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico); a 5- e 12-LOX provocam a resposta inflamatória/desordens alérgicas. A 5-LOX possui atividade de dioxigenase, convertendo o araquidonato, em C-5, nos seus derivados de ácidos gordos 5-HPETE (ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico) que por sua vez origina 5-HETE (ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico) e LTs (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 e LTE_4), que são potentes quimioatratadores e induzem a síntese e libertação de outros mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas e fatores de agregação plaquetar. Por outro lado, a 12-LOX origina 12-HETE, que origina agregação plaquetar e induz a resposta inflamatória.[3, 5, 7, 9-10]

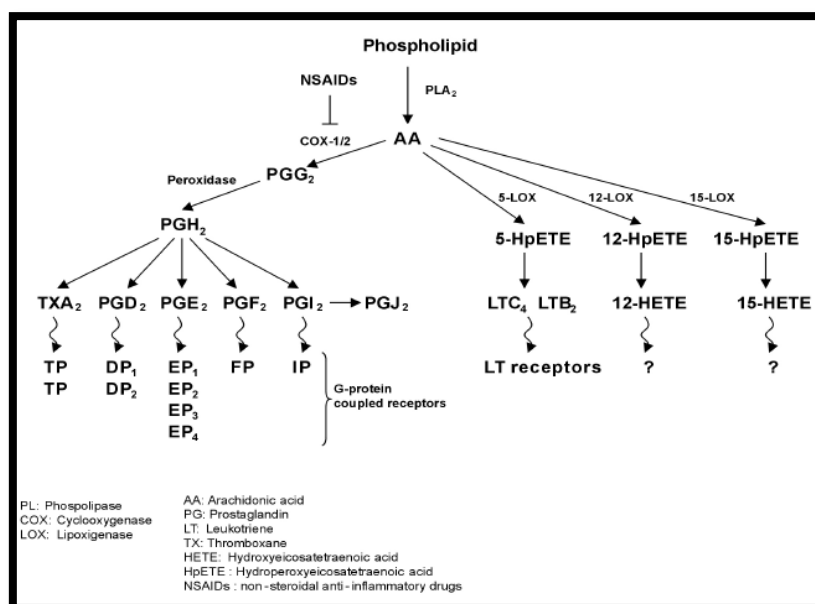


Figura 2. Via do ácido araquidônico (AA). O AA pode ser convertido em prostaglandinas ou leucotrienos, dependendo das enzimas que estão presentes. Cada metabolito exerce a sua ação biológica através de recetores. [3]

Os efeitos biológicos dos LTs podem ser antagonizados ou prevenidos através da inibição da sua síntese pela via da 5-LOX e através de antagonistas de recetores de LTs tendo um uso potencial em diversas doenças inflamatórias e alérgicas [10-11] uma vez que apresentam diversas funções, como se pode verificar na tabela seguinte.

Tabela 2. Funções específicas dos leucotrienos [12]

Leucotrienos	Função	Orgão/ célula
LTB ₄	Quimiotaxia	Neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, monócitos
	Agregação	Neutrófilos, eosinófilos
	Recrutamento, migração, adesão	Granulócitos
	Desgranulação com geração de superóxido	Granulócitos
	Aumento da produção e liberação de citocinas	Granulócitos
	Aumento da citotoxicidade e produção de citocinas	Células T, macrófagos (?)
	Inibição da transformação e secreção	Células T
	Aumento da proliferação, ativação e produção de imunoglobulinas	Células B
	Aumento da permeabilidade	Microvasculatura
	Hiperalgisia	Nervos aferentes
	Papel na síntese de matriz extracelular	Tecido ósseo
	Aumento da reabsorção óssea	Tecido ósseo
LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄	Contração	Músculo liso, segmento das artérias coronárias distais das artérias pulmonares, vasculatura mesentérica, músculo gastrointestinal, brônquios
	Secreção de muco e edema	Brônquios
	Aumento da permeabilidade	Microvasculatura
	Recrutamento de células inflamatórias	Linfócitos, eosinófilos
	Estimulação da secreção de glicoproteínas	Pulmão
	Remodelação das vias aéreas na inflamação alérgica crônica	Pulmão
LTC ₄ , LTD ₄ são biologicamente equipotentes enquanto que LTE ₄ é menos ativo.		

Para além das suas funções, os LTs estão relacionados com diversas desordens tais como a asma brônquica, rinite alérgica, doenças inflamatórias intestinais e doenças de pele, artrite reumatóide, cancro, osteoporose e doenças cardiovasculares.[13]

O desenvolvimento do conceito de inibidores de LTs surgiu da ideia de que estes mediadores inflamatórios são sintetizados na superfície celular, e as suas ações são mediadas através de recetores da superfície celular. Contudo, estabeleceu-se agora que a produção destes inibidores ocorre na membrana nuclear e que existem recetores de LTs em diferentes compartimentos celulares.[11] Assim, têm sido feitos esforços de forma a estabelecer possibilidades farmacológicas para inibir a síntese de LTs por inibição da atividade da enzima 5-LOX e também da proteína ativadora da 5-LOX (FLAP) e por antagonismo do LTB₄ e recetores de leucotrienos cisteínil, tal como se encontra representado na figura 3. [11, 13]

Na maioria dos estudos desenvolvidos, os compostos derivados de plantas foram testados ao nível da capacidade de bloqueio da síntese de LTs em células isoladas em ratos e em humanos.[13]

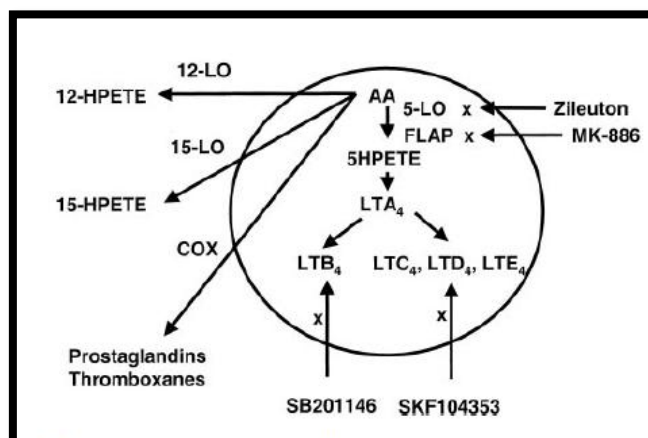


Figura 3. Inibição da atividade dos leucotrienos. HPETE, ácido 5-hidroperoxi-6,8,11,14-eicosatetraenóico; LTC₄, leucotrieno C₄; LTD₄, leucotrieno D₄; LTE₄, leucotrieno E₄ [11]

A administração oral de inibidores da 5-LOX, inibidores da FLAP, e inibidores da LOX/COX juntamente com antagonistas dos recetores de LTB₄ em animais levou a uma inibição do influxo de neutrófilos e do edema tecidual.[11]

Os inibidores da 5-LOX impedem os sinais relacionados com o crescimento e induzem a morte celular programada (apoptose) em neurónios, mastócitos, e células mesoteliais e endoteliais em linhas celulares com cancro pulmonar, próstata, mama e pâncreas.[14] Foi recentemente demonstrado que a expressão de mRNA para a 5-LOX e que a produção de produtos da 5-LOX está elevada em fígados de ratos com cirrose induzida por CCl₄. [14] É assim importante a elucidação da estrutura da 5-LOX e a compreensão da regulação da ativação da 5-LOX e a sua catálise.[13]

Os modelos computacionais da estrutura da 5-LOX indicam que esta enzima é constituída por um domínio “N-terminal C2-like β-barrel”, com funções distintas e um domínio C-terminal catalítico.[13]

Este C-domínio contém um ferro não heme no local ativo, coordenado por His-367, His-372, His-550, Asn-554 e Ile C-terminal. O ferro não hémico atua como um aceitador de elétrons ou dador durante a catálise. Na forma ativa, o ferro encontra-se no estado ferroso (Fe²⁺) enquanto a 5-LOX cataliticamente ativa requer a conversão à forma férrica (Fe³⁺) através da oxidação por hidroperóxidos lipídicos (LOOH). De notar que a maioria dos inibidores da 5-LOX, tanto os sintéticos como os de origem natural (ex.: polifenóis, cumarinas, quinonas) atuam no domínio catalítico por redução ou quelação no local ativo do ferro, por redução da ativação do LOOH, ou simples captura de elétrons que participam no ciclo redox do ferro. Por outro lado, os dados disponíveis demonstram que a inibição farmacológica da 5-LOX ocorre por interferência com o domínio C2-like.[13] O domínio C2-like tem uma função reguladora demonstrada pela capacidade de se ligar a vários lípidos,

dicatões como Ca^{2+} e Mg^{2+} e à proteína coactosina-like. Estas interações estimulam a catálise da 5-LOX.[13]

Dois substratos naturais das LOX são o ácido linoleico (ácido octadeca-9Z,12Z-dienóico, AL) e o ácido araquidónico (ácido eicosatetra-5E,8E,11E,14E-enóico, AA). O AA é considerado como o principal substrato para as LOX de origem mamífera, enquanto o AL é o substrato padrão para as LOX das plantas.[8]

Em 1981, Bokoch e Reed identificaram o polifenol ácido nordihidroguaiarético (NDGA) na *Larrea divaricata*, planta presente no deserto mexicano, como sendo o primeiro inibidor da 5-LOX de origem natural.[13]

Tal como o NDGA, o ácido cafeico (compostos fenólicos lipofílicos), e a eupatilina e a 4-demetileupatilina (flavonas) tem propriedades redutoras, atuando como antioxidantes. Paralelamente, a esculetina e o derivado da *orto*-dihidroxicoumarina presente em várias plantas, foram identificados como inibidores da 5-LOX. De notar que estes compostos têm uma estrutura parcial de catecol em comum, e assume-se que a combinação da quelação-ferro e a capacidade antioxidante desta porção é eventualmente responsável pelo desacoplamento do ciclo catalítico da 5-LOX. Uma segunda classe de inibidores da 5-LOX derivados das plantas é constituída por compostos sem propriedades redutoras que podem mimetizar estruturas de ácido gordos (ácido araquidónico) incluindo poliactilenos e triterpenos e assim, inibir a atividade da 5-LOX por ligação e/ou competição com os locais de ligação ao substrato.[13]

1.3. Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são os fármacos mais utilizados no tratamento da inflamação aguda. Contudo, para além de não possuírem efeitos significativos em doenças inflamatórias crónicas, estão associados a efeitos adversos como a ulceração gástrica, a hemorragia gastrointestinal, a falha renal e o broncospasmo, devidos principalmente à inibição da COX-1.[3, 7, 15]

Acredita-se que o efeito anti-inflamatório resulte da inibição da formação de prostaglandinas pela prostaglandina H sintetase (COX, cicloxigenase), que permite a conversão do ácido araquidónico libertado pelas membranas fosfolipídicas em prostaglandinas.

O tratamento com AINEs ou inibidores seletivos da COX-2 leva a uma produção excessiva de potentes moléculas mediadoras inflamatórias e reações alérgicas - leucotrienos, pela via da 5-LOX, podendo agravar a toxicidade associada à falta de prostaglandinas e excesso de produção de leucotrienos. Por exemplo, as elevadas concentrações de LTB_4 presentes nas paredes estomacais levam à atração de leucócitos para o estômago contribuindo assim para a ulceração.[9-10, 15]

Assim, tem sido sugerida a produção de novos fármacos anti-inflamatórios com maior eficácia por inibição dupla da COX e da 5-LOX, evitando-se desta forma os efeitos adversos associados com a toma de AINEs.[3, 7] A inibição da 5-LOX por si só ou por meio de inibição dupla da 5-LOX/COX proporciona a inibição de uma gama mais ampla de mediadores.[11]

Os inibidores da 5-LOX e os antagonistas dos receptores do LTB₄ são considerados como tratamentos potenciais em condições inflamatórias mais tardias.[11]

Aparentemente a inibição da 5-LOX exerce efeitos tanto sobre a resposta imune como na resposta inflamatória em doentes com DPOC (doença pulmonar obstrutiva crónica), e esta pode ser benéfica na redução das respostas inflamatórias agudas, em que essas respostas são excessivas, mesmo que a progressão da doença não diminua.[11]

As substâncias naturais ou derivadas de plantas constituíram os primeiros inibidores da 5-LOX identificados no início dos anos 80.[13]

1.4. Produtos naturais com atividade anti-inflamatória

Os produtos naturais têm sido utilizados como produtos medicinais há centenas de anos apesar das fontes e aplicações variarem de região para região. O conhecimento dos produtos naturais forneceu uma importante fonte na descoberta terapêutica permitindo assim o desenvolvimento de muitos fármacos. Apesar dos compostos químicos puros serem agentes terapêuticos muito potentes, podem causar efeitos adversos que conduzem a uma fraca tolerância pelo doente, aplicação limitada e conseqüente retirada do mercado. A percepção do consumidor está a crescer no sentido de que o uso de produtos naturais bioativos, próximo do seu estado natural, pode originar menos efeitos adversos e ser semelhante ou ainda mais efetivo que os compostos sintetizados quimicamente.[4]

É possível que consumindo compostos bioativos como parte de uma mistura complexa - i.e. no seu ambiente químico natural - haja redução do potencial para efeitos adversos já que os diferentes componentes podem influenciar a absorção, metabolismo e excreção do bioativo principal. Para além disso, os compostos de um complexo natural podem atuar sinergicamente de uma forma difícil de revelar experimentalmente e produzir efeitos impossíveis de serem replicados por um único composto puro. Dados recentes de diversos laboratórios sugerem que os produtos naturais tendem a atuar mais subtilmente e amplamente que a maioria dos fármacos, com efeitos modestos nos múltiplos passos da cascata inflamatória em vez de exercerem uma ação potente num único passo, como acontece com os fármacos desenhados para esse feito.[4]

De todos os compostos de origem natural, os flavonóides são os mais reconhecidos por possuírem atividade anti-inflamatória, pelo que se torna importante avaliar a sua atividade não só de forma a estabelecer mecanismos anti-inflamatórios mas também de forma a contribuir para o desenvolvimento de novas classes de agentes anti-inflamatórios.[5]

1.4.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos polifenólicos que formam um grupo muito extenso, pelo número dos seus constituintes naturais já conhecidos (mais de 4000) e ampla distribuição no reino vegetal e geralmente são consumidos em alimentos, chás, vinhos, através da medicina tradicional e em fármacos.[13, 16-17]

São conhecidos pelas suas várias funções na natureza contribuindo não só para a cor e sabor dos alimentos (frutas, vegetais e especiarias), como também formando um grande grupo de metabolitos secundários com atividades biológicas/farmacológicas muito diversas como atividade anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antiviral e antitrombótica.[13, 17-18]

Estudos epidemiológicos indicam que as populações que consomem alimentos ricos em polifenóis têm uma menor incidência de desordens inflamatórias crônicas.[13]

São moléculas de baixo peso molecular que estão presentes em toda a parte aérea da planta e ocasionalmente noutras regiões como raízes e sementes e têm por base a estrutura da flavona, ou seja, são formados por um núcleo benzopirano ou cromano ao qual se encontra ligado um anel aromatic (figura 4).[16, 18]

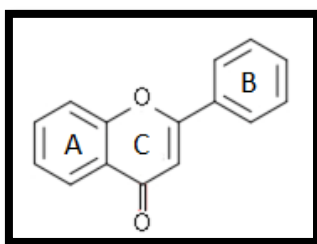


Figura 4. Estrutura química da flavona (2-fenil-benzopirano)

Podem estar presentes no seu estado livre e como glicósidos (O-heterósidos ou C-heterósidos), constituindo um dos maiores grupos de fenóis de origem natural.[19]

Os vários tipos de estrutura dos flavonóides diferem no grau de oxidação do anel C e no padrão de substituições dos anéis A e/ou B, conferindo aos flavonóides diferentes atividades farmacológicas.[18, 20] Entre as diversas atividades biológicas/farmacológicas, uma das mais descritas na literatura é a sua capacidade anti-inflamatória tanto ao nível do estabelecimento de mecanismos anti-inflamatórios como no desenvolvimento de novas classes de agentes anti-inflamatórios ao nível de doenças inflamatórias como a doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC) e a osteoartrite. Têm sido propostos vários mecanismos de ação celular que explicam a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos flavonóides: atividade antioxidante e anti-radicalar, regulação da atividade de células relacionadas com a inflamação (ex., macrófagos, linfócitos, neutrófilos), inibição da libertação de histamina, inibição da proliferação de células-T e ainda modulação da atividade das enzimas metabolizadoras do ácido araquidónico.[5, 17] Por exemplo, o efeito dos polifenóis na 5 e na 12-LOX tem sido muito estudado ao nível das propriedades anti-inflamatórias.[3] Vários destes mecanismos atuam em múltiplos locais da

maquinaria celular, mas os principais mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória dos flavonóides parecem ser o efeito nas enzimas produtoras de eicosanóides e o efeito na expressão de moléculas pró-inflamatórias.[5]

A ligação dupla C-2,3 é essencial para a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos flavonóides e esta depende dos padrões e números de hidroxilações/metoxilações no anel A/B: [5]

- A 5,7-hidroxilação no anel A e a 4'-hidroxilação no anel B são favoráveis.
- A 5,7-dihidroxilação no anel A e o 3',4'-catecol no anel B são importantes.
- O grupo C-3 hidroxilo é favorável para a inibição da LOX e para a atividade anti-inflamatória oral.
- As flavonas sem o grupo C-3 hidroxilo têm maior capacidade de desregulação da expressão do gene pró-inflamatório
- As flavonas/flavonóis com substituições em C-6 ou C-8 possuem também estruturas favoráveis.

Na tabela 3 estão representadas alguns exemplos de flavonóides que ocorrem naturalmente e na figura 5 as estruturas químicas dos flavonóides mais comuns.

Tabela 3. Alguns exemplos de subclasses de flavonóides que ocorrem naturalmente [21]

Classe	Flavonóides	Substituintes					
		3	5	7	3'	4'	5'
Flavan-3-óis	(+)-catequina	OH	OH	OH	OH	OH	H
Antocianidinas	Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H
	Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	H
Flavonas	Apigenina	H	OH	OH	H	OH	H
	Diosmina	H	OH	Oru	OH	Ome	H
	Luteolina	H	OH	OH	OH	OH	H
	Naringenina	H	OH	OH	H	OH	H
Flavanonas	Naringina	H	OH	Oru	H	OH	H
	Hesperetina	H	OH	OH	OH	Ome	H
	Hesperedina	H	OH	Oru	OH	Ome	H
	Floretina	OH (2) ^a	OH (4)	OH (6)	H	H	OH (6')
Chalconas	Floridzina	Ogl (2)	H (4)	OH (6)	H	H	OH (6')
	Quercetina	OH	OH	OH	H	OH	H
Flavon-3-óis	Kaempferol	OH	OH	OH	H	OH	H
	Miricetina	OH	OH	OH	OH	OH	OH
	Fisetina	OH	H	OH	OH	OH	H
	Morina ^b	OH	OH	OH	H	OH	H

ru, rutinose.

^a Número em parêntesis denota substituintes semelhantes adicionais na posição indicada pelo número

^b O Morin têm um grupo OH adicional na posição 2'.

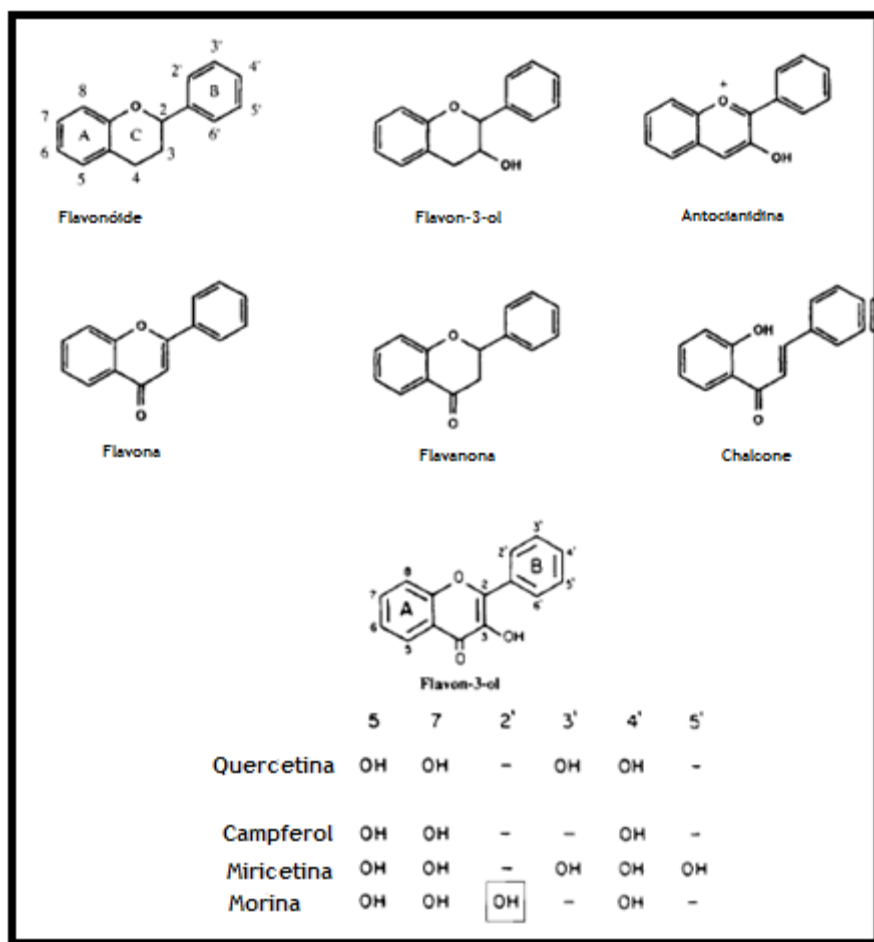


Figura 5. Estruturas químicas das subclasses de flavonóides mais comuns e estrutura geral dos flavon-3-óis e alguns compostos representativos onde o grupo hidroxilo do anel B está presente. [21]

Apesar destes flavonóides não serem adequados para desordens agudas, têm potencial para tratar desordens inflamatórias crônicas devido ao seu mecanismo celular único, com menos efeitos adversos.[5]

A sua ação anti-inflamatória pode ocorrer por interferência diferencial na via dependente do AA (PLA₂, COX, LOX) e na via independente de enzimas ou recetores (NOS, NFκB, PPARs e NAG-1), dependendo da estrutura de cada polifenol.[13]

Apesar de ser difícil estabelecer uma relação estrutura atividade devido às diferenças nas estruturas químicas, as atividades inibitórias contra a 5 e a 12-LOX podem explicar, pelo menos em parte, a atividade anti-inflamatória/antialérgica dos flavonóides.[5]

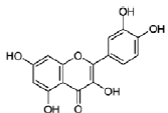
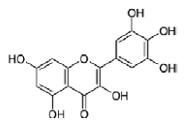
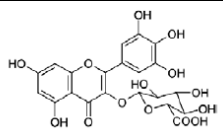
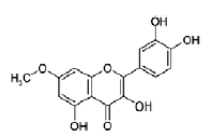
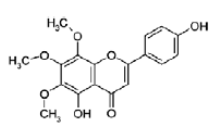
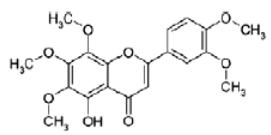
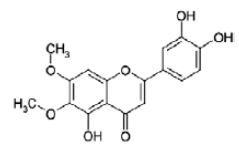
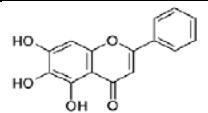
Flavonóides como o campferol, quercetina, morina e miricetina estão presentes nos inibidores da 5-LOX.[3]

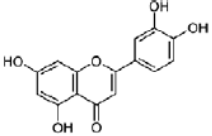
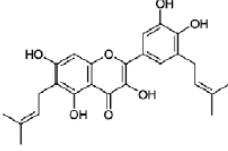
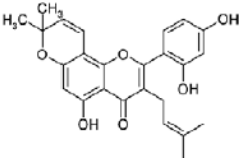
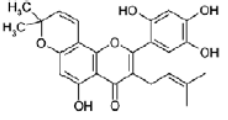
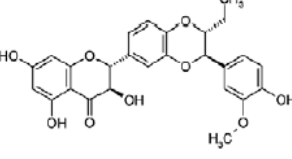
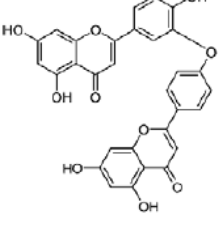
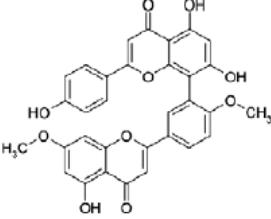
Relativamente à farmacocinética, uma vez que os flavonóides convencionais apresentam uma eficácia fraca após administração oral, provavelmente devido à baixa biodisponibilidade e/ou rápido metabolismo e eliminação, os derivados prenilados mais lipofílicos podem possuir uma melhor capacidade de atravessarem as membranas para além do seu elevado potencial como inibidores da 5-LOX, apresentando-se como um potencial

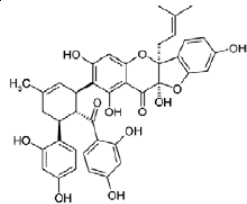
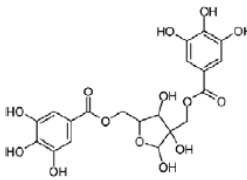
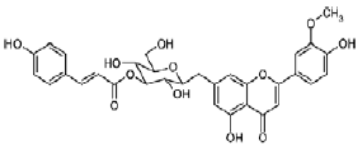
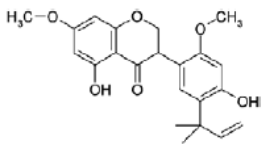
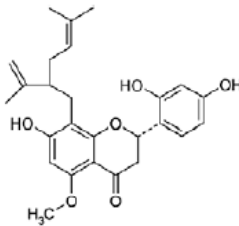
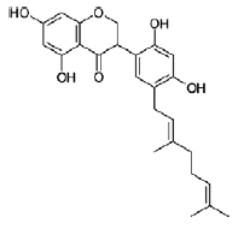
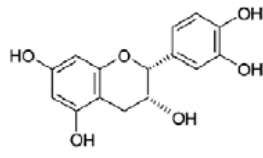
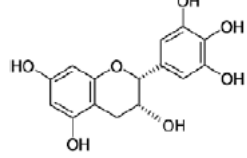
tratamento tóxico para doenças inflamatórias na pele.[13] Em particular, alguns flavonóides prenilados como as artoninas são inibidores potentes para a 5-LOX, exibindo menos inibição para a 12-LOX.[5] Na tabela 4 estão representados alguns exemplos de flavonóides que inibem a síntese de produtos da 5-LOX.

Apesar da baixa biodisponibilidade oral, o consumo habitual de alimentos ricos em flavonóides pode levar a uma diminuição significativa das concentrações plasmáticas de cys-LTs, comprovando-se assim os seus efeitos benéficos.[13]

Tabela 4. Flavonóides que inibem os produtos de síntese da 5-LOX (n.d. - não determinado) [13]

Composto	Estrutura	IC ₅₀ íntacta	IC ₅₀ célula livre	Planta
Quercetina		3.2 µM	0.2 µM, 25 µM	<i>Lonicera japónica</i> , ubiqüitário
Miricetina		13 µM	n.d.	<i>Ubiquitário</i>
Miricetina-3-O-β-D-glucoronóido		0.1 µM (ratos) 2.2 µM (humanos)	n.d.	<i>Epilobium angustifolium</i>
Ramnetina		0.7 µM	n.d.	<i>Guiera senegalensis</i>
Xantomicol		29.2 µM	n.d.	<i>Stachys chrysantha</i>
5-O-demetilnobiletina		0.35 µM	≈ 0.25 µM	<i>Sideritis tragoriganum</i>
Cirsiliol		0.4 µM	0.1 µM	<i>Salvia officinalis</i>
Baicaleina		7.13 µM 9.5 µM	n.d.	<i>Scutellaria baicalensis</i>

Luteolina		0.1 μM	n.d.	Ubiquit�rio
Papiriflavonol		0.64 μM	7 μM	<i>Broussonetia papyrifera</i>
Morusina		n.d.	2.9 μM , > 100 μM	<i>Morus alba</i>
Artonina E		n.d.	0.36 μM	<i>Artocarpus communis</i>
Silibinina		15 μM	n.d.	<i>Silybum marianum</i>
Ochnaflavona		6.56 μM	n.d.	<i>Lonicera japonica</i>
Ginkgetina		0.33 μM	n.d.	<i>Ginkgo biloba</i>

Sanggenona D		n.d.	4 μM	<i>Morus mongolica</i>
Hamamelitannina		n.d.	1 μM	<i>Hamamelis virginiana</i>
Chrisoeriol 7-O-B-(3-E-p-coumaroil)-glucopiranoside		11.1 μM	n.d.	<i>Stachys chrysantha</i>
Equinoisosofaranona		n.d.	19 μM	<i>Echinosophora koreensis</i>
Sofaraflavanona G		n.d.	0.09 - 0.25 μM	<i>Sophora flavescens</i>
Kenusanona A		n.d.	0.5-0.9 μM	<i>Echinosophora koreensis</i>
Epicatequina		n.d.	22 μM	<i>Erythroxylum coca</i>
Epigallocatequina		n.d.	< 30 $\mu\text{g/mL}$	<i>Camellia sinensis</i>

1.4.2. Carqueja - *Pterospartum tridentatum*

A Carqueja, ou Carqueija, é uma Leguminosae que cresce espontaneamente no oeste da Península Ibérica, nomeadamente em Portugal, sendo muito utilizada na medicina popular portuguesa no tratamento de diversas condições patológicas.[22-24]

O seu nome científico é *Pterospartum tridentatum* L. Willk. [= *Chamaespartium tridentatum* (L.) P. Gibbs.; *Genistella tridentata* (L.) Samp.], pertence à família Leguminosae (=Fabaceae) e à subfamília Papilionoideae (=Faboideae) e é de origem autóctone.[25]

É um arbusto pequeno que cresce até 100cm, prostrado ou ereto, sendo habitual o seu crescimento em montanhas do norte de Portugal.[25] Os seus ramos apresentam 2-14mm de largura, com 5-6 costas achatadas e onduladas, duas das quais se assemelham a asas, opostas e mais ou menos desenvolvidas. As folhas são mais ou menos desenvolvidas, unifoliadas; as estípulas têm forma de dentes triangulares, afiados e às vezes recurvados; limbo triangular, reto ou recurvado, semelhante às estípulas e estreitamente ligadas a estas, resultando numa folha com aspeto tridentado (figura 6). As inflorescências são formadas por 3 a 10 flores de cor amarela (figura 7). [26]



Figuras 6 e 7. Folhas e flores de *Pterospartum tridentatum*

As suas flores são normalmente colhidas na primavera e são usadas na medicina tradicional e como condimento na cozinha tradicional portuguesa.[25] A carqueja seca é também usada como lenha em fornos tradicionais e lareiras devido às suas propriedades combustíveis.[25] O uso da carqueja como biomassa para a produção de bioetanol foi já comprovado, uma vez que a carqueja é rica em celulose e hemicelulose (biomassa lenhosa), podendo assim dar origem a bioetanol que é uma alternativa mais ecológica aos combustíveis fósseis e contribuindo para a limpeza das florestas e conseqüente redução do risco de incêndio.[27] O fumo resultante da queima da carqueja é também usado para fumigar as colmeias de abelhas e assim conseguir retirar o mel.[28] Tradicionalmente, a carqueja é uma planta utilizada devido à sua ação digestiva, diurética e estimulante do fígado, estando indicada como auxiliar no tratamento de diversas doenças do trato gastrointestinal e urinário. É também utilizada na forma de infusões no tratamento da anemia, cálculos biliares, diarreia,

problemas de circulação sanguínea, icterícia, parasitas intestinais, irritações da garganta (flores). Como possui efeito diurético está indicada na gota e reumatismo e pode também ser utilizada no tratamento de gripes, bronquites e pneumonias.[24-25, 29] Constitui ainda um ingrediente de diversas misturas herbais usadas para controlo da diabetes tipo 2.[24-25] Geralmente é usada toda a planta, na forma de decocção, contudo está também disponível em cápsulas em ervanárias e estabelecimentos dietéticos. É ainda usada em cataplasma no tratamento de feridas.[29]

Foram realizados estudos etnobotânicos em Portugal, nomeadamente nos Parques Naturais da Serra de São Mamede [30] de Montesinho [31] e da Arrábida [32], sobre plantas medicinais e aromáticas que incluíram a carqueja, dos quais se pode concluir que a parte geralmente mais usada são as flores secas na forma de decocção ou infusão no tratamento de constipações, gripes, tosse, mal-estar, problemas digestivos, de circulação, entre outros, sendo uma das espécies com maior frequência de citações, i.e., uma das plantas às quais é atribuído uma maior número de utilizações. Para além do seu uso a nível medicinal, estes estudos confirmaram o uso da carqueja como condimento.[28, 30, 32]

De notar que a carqueja é uma planta endémica e o uso deste tipo de espécies indica que as pessoas têm um bom conhecimento das plantas que crescem de forma natural a nível local. [30]

Ainda não são conhecidos estudos farmacológicos e toxicológicos relativos a esta espécie, mas os alcalóides e os isoflavonóides são metabolitos secundários característicos das espécies Leguminosae e as suas propriedades farmacotoxicológicas são já conhecidas.[24, 33]

Pterospartum tridentatum é uma espécie muito rica em compostos fenólicos, apresentando elevadas concentrações de flavonóides, sendo o rendimento de extração de compostos fenólicos de 28,61% em extrato etanólico e 12,01% em extrato aquoso.[33-34]

Foram identificados vários constituintes no extrato aquoso de *Pterospartum tridentatum*, através de métodos espectroscópicos, nomeadamente três derivados da genisteína (4',5,7-trihidroxiisoflavona), as isoflavonas sissotrina, genistina, prunetina e o 5,5'-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7-O-β-glucósido que apresentou um padrão de oxigenação diferente no anel B. Foi ainda identificado por HPLC a presença do flavonol 3-O-glicósido isoquercirina, importante para a proteção do dano oxidativo endotelial, de forma dose-dependente e em concentrações não-tóxicas (0.1-1mM) [24] cujas estruturas estão representadas na figura 8. Para além destes compostos foram também já identificados por RP-HPLC no extrato metanólico de *Pterospartum tridentatum* vários compostos fenólicos como o ácido vanílico, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido *p*-cumarínico, ácido ferúlico, ácido elágico e quercetina.[33]

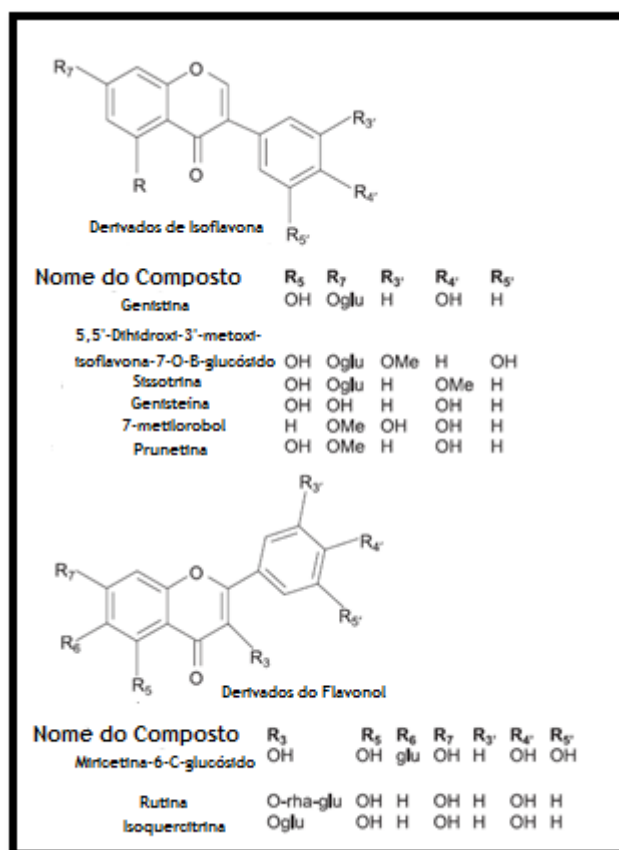


Figura 8. Estruturas químicas de flavonóides identificados no extrato de *P. tridentatum*. glu, glucose; rha, ramnose. [22]

1.5. Determinação da atividade anti-inflamatória

Existem diversos métodos para determinação da atividade anti-inflamatória de extratos de plantas ou de compostos isolados, que variam de acordo com o que se pretende inibir ao nível da cascata inflamatória.

Foram já realizados estudos nos quais se testou a capacidade de alguns extratos de plantas inibirem o aumento da elastase leucocitária humana libertada por neutrófilos, que desempenha um papel vital durante a inflamação, sendo considerada um dos principais marcadores de doenças inflamatórias. Para tal procede-se à realização de um ensaio enzimático, no qual a enzima (elastase leucocitária humana) é incubada com o composto, iniciando-se a reação com a adição do substrato. A reação é seguida espectrofotometricamente a 405 nm, sendo possível calcular a atividade enzimática por comparação com os controlos.[35-36]

O óxido nítrico (NO) está envolvido nas vias inflamatórias independentes do AA, e a sua produção excessiva durante a resposta a uma infeção e em condições inflamatórias, contribui para o stresse oxidativo e consequente dano tecidual devido aos danos provocados nas

macromoléculas e peroxidação lipídica das membranas. Desta forma, foram realizados estudos nos quais se pretendia avaliar a capacidade antioxidante de alguns extratos de plantas de forma a atenuar o processo inflamatório.[37] Para tal procede-se à determinação do nitrito, um produto oxidado estável do NO, sendo a formação deste produto seguida espectrofotometricamente a 550 nm. A concentração de nitrito formado é determinada por comparação com a curva padrão de nitrato de sódio. [37-41]

Por outro lado, vários estudos têm como objetivo regular a expressão de genes pró-inflamatórios através da supressão do NF- κ B. Este é responsável pela regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, que medeiam a resposta aos estímulos inflamatórios.[42] Para avaliar a capacidade que os extratos têm para suprimir a atividade do NF- κ B, é realizado um ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) complementado por análise Western Blot e RT-PCR.[42-44]

Um outro método para avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos de plantas é por indução de inflamação tópica em animais usados para ensaios experimentais e avaliação da capacidade do extrato de reduzir o edema.[45]

O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos de *Pterospartum tridentatum* por inibição da enzima 5-lipoxigenase, a qual pode ser realizada através de diversos métodos.

Os ensaios de inibição da enzima 5-lipoxigenase (5-LOX) podem ser realizados diretamente em monócitos e neutrófilos isolados a partir do sangue humano ou animal, que são pré-incubadas com os compostos a testar sendo adicionada posteriormente a enzima. Este tipo de ensaio permite avaliação da formação do leucotrieno B₄ (LTB₄) e de leucotrienos cisteinil (LTC₄/D₄/E₄) através de imunoensaios.[46-48]

Uma vez que a 5-LOX desempenha um papel essencial no crescimento e sobrevivência celular, pode também ser avaliado o modo como a inibição da enzima influencia a redução do número de células Kupffer e atenua a inflamação e fibrose verificada em doenças hepáticas.[14] As células de Kupffer são o único tipo de células hepáticas relacionadas com a via metabólica da 5-LOX e como tal é possível analisar a formação de 5-HETE, por RP-HPLC, quando as células são postas em contato com extratos de plantas, os quais se pensa terem atividade inibitória da enzima. É também possível avaliar a formação de LTB₄ nestas células através de imunoensaios. As conclusões dos resultados obtidos com os ensaios realizados a partir de células Kupffer podem ser corroboradas com as que se obtêm com ensaios como a análise das propriedades anti-proliferativas e de apoptose realizados com inibidores da enzima.[14, 49]

A 5-LOX catalisa a oxidação de ácidos gordos insaturados que possuam a estrutura 1-4 pentadieno e o ácido araquidónico (AA) constitui um substrato biológico para esta enzima. Assim, o ácido linoleico (AL), cuja estrutura está representada na figura 9, pode também ser usado com substrato para a enzima.[50]

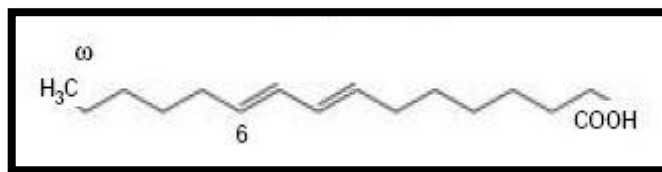


Figura 9. Estrutura química do ácido linoleico

A inibição da formação do produto resultante da ação da enzima 5-LOX durante o processo inflamatório, o 5-HETE, pode ser avaliada através de determinações espectrofotométricas. De uma maneira geral a enzima é incubada com o composto em análise, sendo posteriormente adicionado o substrato. A inibição da enzima e a modificação da insaturação do ácido linoleico (dieno 1-4 → dieno 1-3) pelos extratos pode ser seguida a 234 nm, de um modo concentração-dependente.[10, 51-53] Como composto de referência em estudos de inibição da 5-LOX usa-se o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) ou o zileuton, devido à sua elevada capacidade inibitória desta enzima.[50, 52, 54]

A atividade da enzima 5-LOX pode ainda ser avaliada através de um outro método espectrofotométrico designado por ensaio FOX que se baseia no princípio de que em meio ácido a hidroxidação lipídica oxida o Fe^{2+} a Fe^{3+} , oxidando o corante laranja xilenol formando um produto que absorve na região do visível.[53, 55-57]

Vários estudos evidenciam a importância que cofatores como o ATP, Ca^{2+} e a L- α -fosfatidilcolina (PC) assumem na ativação da enzima 5-LOX de origem humana, potenciando a sua reação com o substrato usado e a formação de 5-HETE, potenciando assim a sua atividade. [57-59]

O objetivo deste trabalho é à avaliar a capacidade que os extratos de Carqueja (caules e folhas, e flores) têm para inibir a enzima 5-LOX humana, através de ensaios espectrofotométricos com determinações na zona do UV e no visível (ensaio FOX).

2. Material e Métodos

2.1. Matéria vegetal

Para a realização deste trabalho foram usados extratos metanólicos de carqueja, a qual foi identificada como *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk subsp. *cantabricum* (Spach) Talavera & P.E. Gibbs pelas Prof.^a Dr.^a Dalila Espírito Santo e Dr.^a Paula Paes do Herbário do Instituto Superior de Agronomia do Jardim Botânico d'Ajuda (Lisboa), onde ficou guardada uma amostra.

Os extratos foram obtidos e gentilmente cedidos por Ângelo Luís (CICS - Universidade da Beira Interior) a partir das partes aéreas do arbusto (caules e folhas, e flores) recolhido na Serra da Estrela. Tanto o extrato de caules e folhas, como o extrato das flores encontravam-se dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) numa concentração de 200mg/mL.

2.2. Reagentes químicos

Para a realização deste trabalho experimental foram usados os seguintes reagentes químicos: água MilliQ, Tween®20, dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de cálcio anidro (CaCl₂), adenosina trifosfato (ATP) dissódica, ácido linoleico, ácido sulfúrico, sulfato de ferro, metanol, Tris e HCL. Todos estes reagentes eram de qualidade analítica. Foram ainda usados a enzima 5-lipoxigenase recombinante humana (EC 1.13.11.34) e o ácido nordihidroguaiarético (NDGA) da Cayman Chemical e o laranja xilenol sal disódico e a fosfatidilcolina (PC) da Sigma-Aldrich.

2.3. Equipamentos

Para medição das absorvâncias tanto no ensaio espectrofotométrico como no ensaio colorimétrico foi usado um espectrofotómetro UV/vis Ultroscopec® 3000.

2.4. Preparação das amostras

Como composto de referência para este estudo de inibição da 5-LOX foi utilizado o ácido nordihidroguaiarético (NDGA), devido á sua elevada capacidade inibitória desta enzima.[50, 52, 54] Foi preparada uma solução de NDGA em DMSO e Tween®20, bem como a diluição dos extratos de caules e folhas e de flores de *Pterospartum tridentatum* para uma concentração de 10mg/mL. A partir destas soluções-mãe foram preparadas as diluições para

as concentrações de 0,5, 1, 2, 5 e 10 mg/mL, as quais foram analisadas no ensaio espectrofotométrico e no ensaio colorimétrico.

2.5. Ensaio Espectrofotométrico

Como já foi referido a 5-LOX é responsável pela catálise da oxidação dos ácidos gordos que contenham o dieno 1-4 e a modificação do ácido linoleico (dieno 1-4 para dieno 1-3) pode ser detetada a 234 nm, bem como a conversão do produto 5-HPETE para 5-HETE.[52, 60]

Para a realização do ensaio espectrofotométrico foram adaptados procedimentos já descritos na literatura.[10, 50-52, 61] Foram incubados durante 4 minutos à temperatura ambiente 10µl da amostra, com 20µl de enzima 5-LOX recombinante humana (5,42 unidades) e 5.46mL de tampão Tris-HCl (50mM, pH=7.4) que contém CaCl₂ (0.4mM), fosfatidilcolina (PC) (24µg/mL) e ATP (0.2mM). Posteriormente foram adicionados 10µl de ácido linoleico. A inibição enzimática foi seguida espectrofotometricamente com aumento da absorvância a 234 nm. Como branco é usada a solução com tampão Tris-HCl (50mM, pH=7.4) com CaCl₂ (0.4mM), PC (24µg/mL) e ATP (0.2mM). O controlo negativo é composto por 2.47mL de mistura da mesma solução usada com branco (5mL) e DMSO e Tween@20 (25µl).

A percentagem de inibição da atividade enzimática é calculada por comparação com o controlo negativo através da fórmula (1), onde A₀ corresponde à absorvância do controlo negativo e A₁ da amostra a testar:

$$\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

A concentração da amostra que provoca a inibição da enzima em 50% (IC50) obtém-se relacionando a percentagem de inibição com as concentrações da amostra.[51] Os valores de IC50 para este composto são muito variáveis, dependendo da fonte de 5-LOX variando por exemplo de 0.26µM (células peritonias de ratos) a 44µM (soja).[50]

2.6. Ensaio FOX

A lipoxigenase possui um ferro não hémico que catalisa a dioxigenação de ácidos gordos polinsaturados que contenham um (1Z-4Z)-pentadieno, como o ácido araquidónico ou o ácido linoleico.[53, 55]

Um método colorimétrico, como o ensaio FOX, para determinação da atividade da lipoxigenase pode ser aplicado em diversos ensaios. Este ensaio baseia-se no princípio de que um hidroperóxido lipídico pode oxidar o Fe²⁺ a Fe³⁺, o qual em meio ácido oxida o laranja xilenol formando o complexo Fe³⁺/laranja xilenol que absorve na região do visível.[53, 55, 57] Os inibidores da 5-LOX, como o zileuton, reduzem a velocidade inicial da atividade enzimática

de uma forma dependente da concentração, com valores de IC50 de aproximadamente 0.1-0.2 μ M para a 5-LOX de ratos e humana.[57]

Para a realização deste ensaio foi adaptado um procedimento já descrito por Cho e colaboradores.[57] Foram pré-incubados 20 μ l de enzima 5-LOX recombinante humana (5.42unidades), durante 4 minutos à temperatura ambiente, com 10 μ l da amostra e com 825 μ l de tampão Tris-HCl (50mM, pH=7.4) que contém CaCl₂ (0.4mM), PC (24 μ g/mL) e ATP (20 μ M). A reação é iniciada após a adição de 10 μ l de ácido linoleico, que fica em incubação com a enzima durante mais 4 minutos. A reação é terminada com a adição do 1,650mL de reagente FOX, composto por: solução de ácido sulfúrico (25mM), solução de laranja xilenol (100 μ M), solução de sulfato de ferro (II) (100 μ M) e metanol:água (9:1). A cor amarela do laranja xilenol acidificado é convertida em azul devido à hidroperoxidação lipídica que medeia a oxidação dos íons Fe²⁺ e a interação resultante entre os íons Fe³⁺ e o corante. O aumento da absorvância esperado devido à formação do complexo é seguido a 620 nm durante 12 minutos, uma vez que a cor gerada estabiliza em 10 minutos.[53] O branco utilizado neste ensaio é preparado sem substrato durante a incubação, sendo este adicionado após o término, isto é, após a adição do reagente FOX.

A concentração de ATP utilizada no ensaio colorimétrico é inferior à usada no ensaio espectrofotométrico, uma vez que o ATP atua como um supressor do complexo corado que se forma na reação FOX, em aproximadamente 65%, de uma forma dependente da concentração entre 25-200 μ M. Assim, a concentração ótima de ATP utilizada em ensaios FOX é de 20 μ M, com a qual a perda de atividade enzimática é minimizada.[57]

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio Espectrofotométrico

As absorvâncias registadas a 234 nm para cada uma das amostras (NDGA, extrato de caules e folhas e extrato de flores) encontram-se descritas na tabela A dos Anexos-Parte I e representadas no gráfico seguinte.

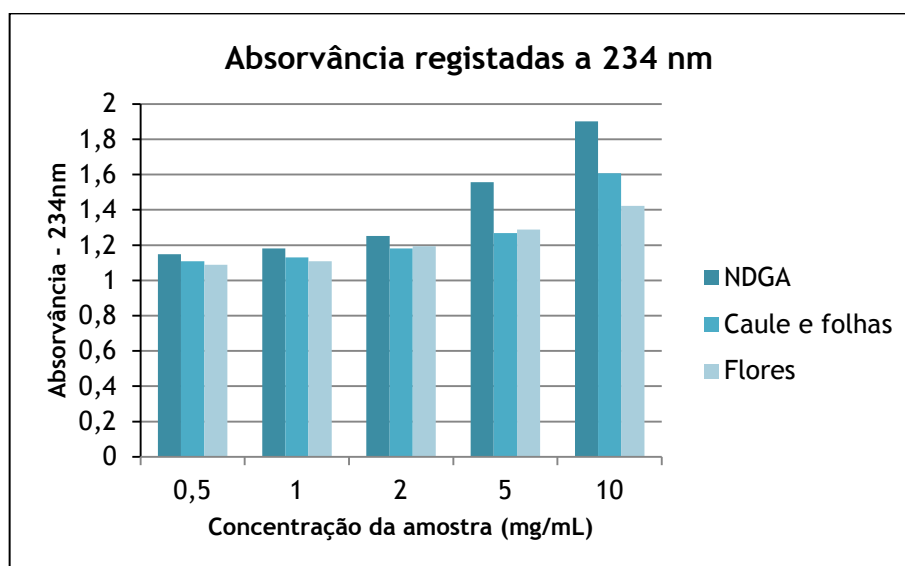


Figura 10. Gráfico com as absorvâncias registadas para cada uma das concentrações das amostras em análise

A absorvância registada para o controlo negativo foi de 0,087. Desta forma, e de acordo com a equação descrita no ponto 2.5. é possível calcular a % de inibição enzimática para cada uma das concentrações analisadas de cada amostra. A tabela com os valores obtidos de % de inibição enzimática para cada uma das concentrações de cada amostra encontra-se nos Anexos - Parte I. Os gráficos das figuras 11-13 representam a relação entre a % de inibição e a concentração da amostra.

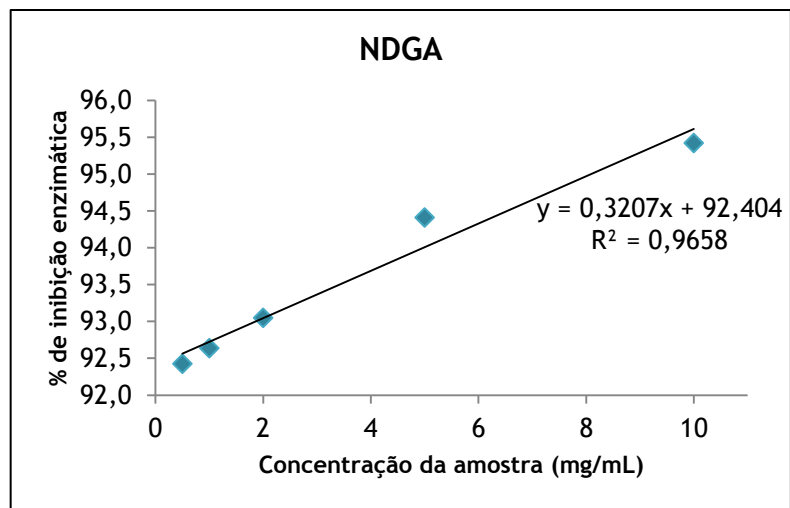


Figura 11. Curva que relaciona a % de inibição enzimática com as várias concentrações de NDGA utilizadas

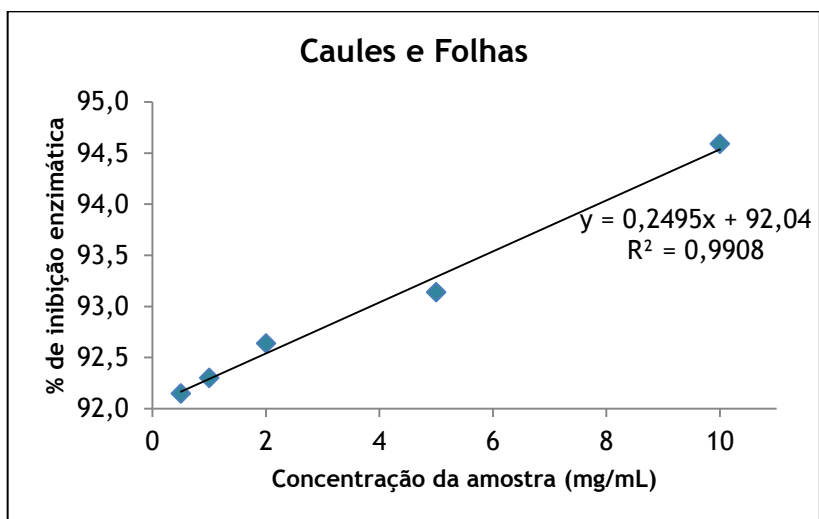


Figura 12. Curva que relaciona a % de inibição enzimática com as várias concentrações do extrato de caules e folhas de *Pterospartum tridentatum* utilizadas

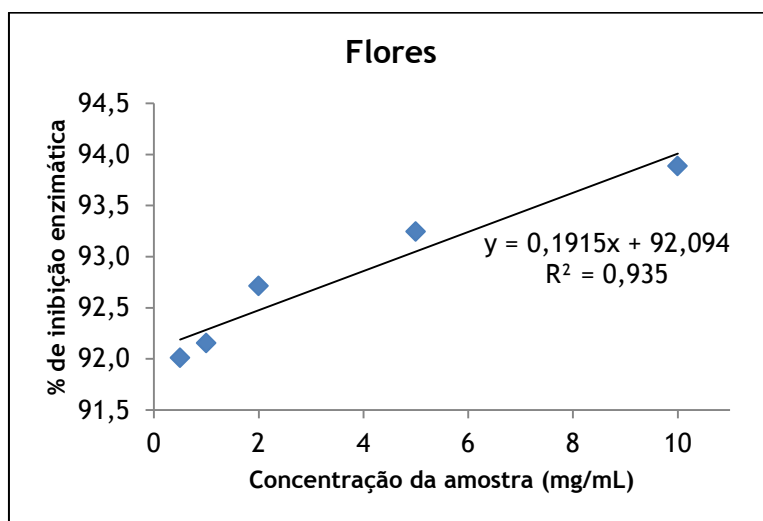


Figura 13. Curva que relaciona a % de inibição enzimática com as várias concentrações do extrato de flores de *Pterospartum tridentatum* utilizadas

De acordo com equações obtidas a partir da curva para cada uma das amostras é impossível calcular a concentração em que ocorre 50% de inibição da enzima, isto é, a IC50, uma vez que para o intervalo de concentrações avaliado as % de inibição enzimática encontram-se sempre acima de 90%

Contudo, tal como o descrito na literatura[50-51] e como é possível verificar no gráfico da figura 10, observa-se um aumento da absorvância à medida que a concentração de extrato aumenta. Avaliando os valores obtidos para as absorvâncias das várias concentrações dos extratos e do NDGA, representados na figura 10, e as curvas representadas nas figuras 11-13, que relacionam a % de inibição enzimática com as várias concentrações das amostras, é possível verificar que os extratos de carqueja têm uma capacidade inibitória da enzima 5-LOX elevada, semelhante à do NDGA, uma vez que os valores de absorvância são semelhantes, bem como as percentagens de inibição obtidas. Para além disso, os elevados valores de R^2 (coeficiente de determinação) obtidos para os gráficos das figuras 11-13 comprovam a relação entre a concentração e a % de inibição enzimática de cada amostra. A diferença da capacidade de inibição entre os dois extratos não é muito evidente nas concentrações de 0.5, 1, 2 e 5mg/mL, sendo notória a maior capacidade de inibição do extrato de caules e folhas na concentração de 10mg/mL.

3.2. Ensaio FOX

Neste ensaio espera-se que a cor amarela do laranja xilenol acidificado seja convertida em azul devido à hidroperoxidação lipídica que medeia a oxidação dos iões Fe^{2+} e a interação resultante entre os iões Fe^{3+} e o corante, sendo a formação deste complexo seguida a 620 nm.

Após a incubação da enzima com a amostra e adição do reagente FOX, e imediatamente antes de se dar início à leitura das absorvâncias, o aspeto de cada solução era o representado pela seguinte figura:

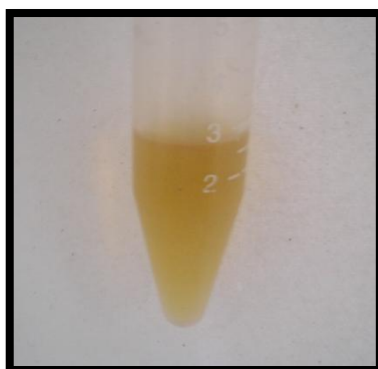


Figura 14. Aspeto de uma das soluções após ser adicionado o reagente FOX

Tal como referido pela literatura [53, 55-57], verificou-se um aumento da absorvância ao longo do período de tempo durante o qual foi efetuada a leitura (12 minutos). Este

aumento de absorvância traduz a formação do complexo entre o Fe^{3+} e o laranja xilenol, sendo evidente a formação da coloração azul após remoção da célula do espectrofotômetro. A figura 15 traduz a formação do complexo azul para as várias concentrações de NDGA após a leitura das absorvâncias durante 12 minutos, tendo este precipitado após alguns minutos. A formação da coloração azul observou-se também para as várias concentrações de extrato de caules e folhas e de extrato de flores de *Pterospartum tridentatum*.

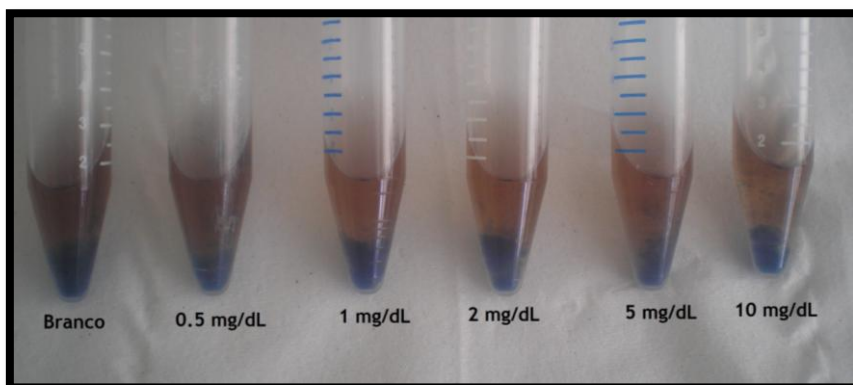


Figura 18. Formação do complexo Fe^{3+} /laranja xilenol para as várias concentrações de NDGA

As absorvâncias medidas a 620 nm durante 12 minutos para cada uma das concentrações de NDGA, extrato de Caules e Folhas, e extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*, encontram-se registadas na Tabela C, D e E dos Anexos - Parte I, e representadas nos gráficos das figuras 16, 17 e 18.

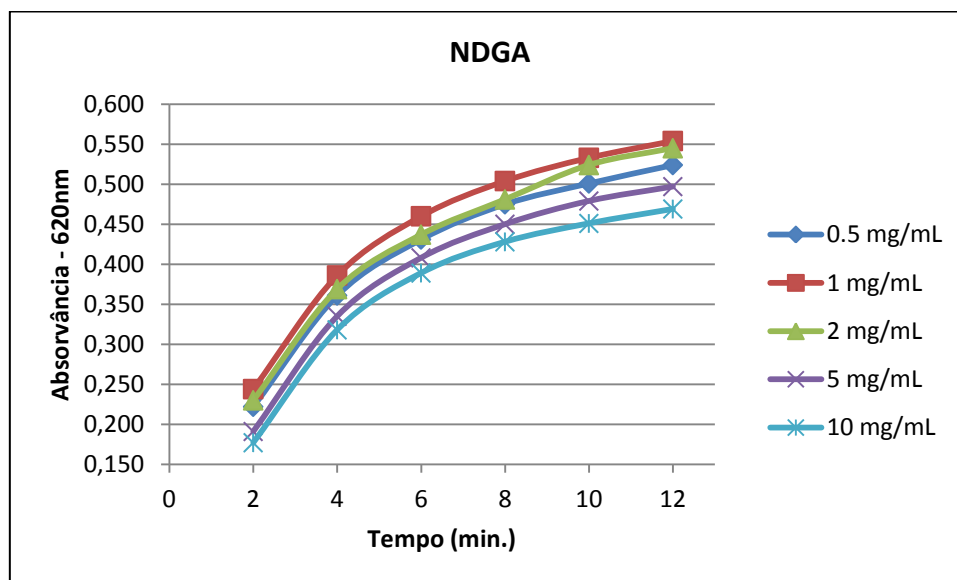


Figura 16. Absorvâncias registadas em função do tempo para as diversas concentrações de NDGA

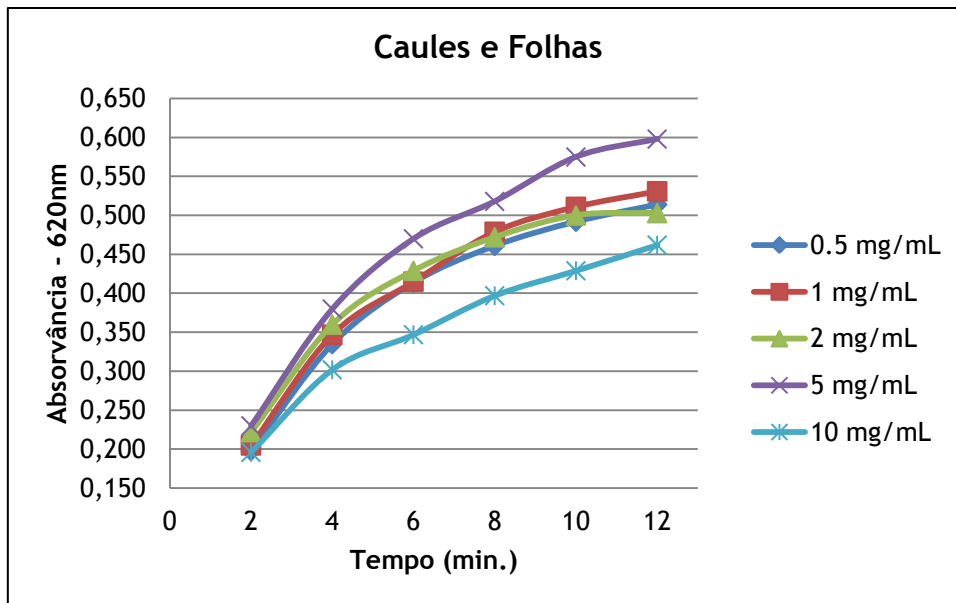


Figura 17. Absorvâncias registadas em função do tempo para as diversas concentrações de extrato de Caules e Folhas de *Pterospartum tridentatum*

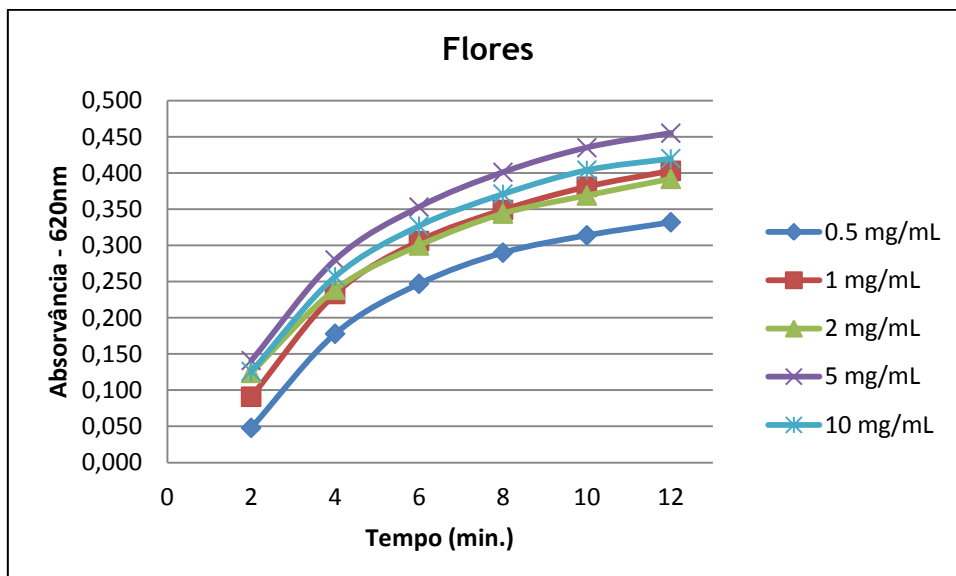


Figura 18. Absorvâncias registadas em função do tempo para as diversas concentrações de extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*

Tendo em conta que os inibidores da enzima 5-LOX diminuem a velocidade inicial da atividade enzimática de uma forma dependente da concentração, quanto menor for o declive da reta obtida a partir da relação absorvância/tempo, menor será essa velocidade. Posto isto, e avaliando as equações obtidas para cada uma das retas traçadas nos gráficos das figuras 16, 17 e 18 é possível determinar o declive da reta para cada uma das concentrações, que se encontram representados na tabela 5.

Tabela 5. Declives das retas obtidas para as várias concentrações de cada uma das amostras (NDGA, extrato de Caules e Folhas e extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*)

	NDGA	Caules e Folhas	Flores
0,5 mg/mL	0,0282	0,0300	0,0267
1 mg/mL	0,0291	0,0312	0,0292
2 mg/mL	0,0298	0,0267	0,0253
5 mg/mL	0,0286	0,0353	0,0298
10 mg/mL	0,0271	0,0252	0,0279

Avaliando os declives obtidos é possível concluir que as concentrações que provocam uma maior redução da atividade enzimática da enzima 5-LOX é a de 10mg/mL para o NDGA e para o extrato de Caules e Folhas e a de 2 mg/mL para o extrato de Flores. Uma vez que, segundo a literatura [33], é nas flores de *Pterospartum tridentatum* que está presente uma maior quantidade de flavonóides, seria de esperar que se obtivessem declives menores, de um modo concentração-dependente para o extrato de flores, ou seja, um menor declive para a concentração de 10mg/mL. Contudo tal não se verificou provavelmente devido a algum erro experimental que possa ter ocorrido durante a preparação desta amostra.

Através deste ensaio é mais uma vez possível confirmar a elevada capacidade de redução da atividade enzimática do extrato de Caules e Folhas e do extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*, face aos valores obtidos para o NDGA.

4. Conclusões

Os medicamentos são substâncias que possuem propriedades curativas ou preventivas de uma doença ou dos seus sintomas. Contudo, muitas vezes a toma de medicamentos está associada a efeitos adversos que comprometem a qualidade de vida dos doentes agravando outras patologias concomitantes. É o caso dos anti-inflamatórios, cuja toma está associada a efeitos indesejáveis como a ocorrência de distúrbios gastrointestinais.

Na flora que nos rodeia são inúmeras as espécies consideradas como “medicinais” usadas ancestralmente na forma de infusões, decocções e cataplasmas, pelas suas propriedades em diversas patologias de natureza inflamatória. A pesquisa dos compostos com atividade anti-inflamatória presentes nestas espécies constitui uma promissora fonte de novos anti-inflamatórios que, pelo seu mecanismo de ação mais amplo, possam originar menos efeitos adversos no doente, tendo sido desenvolvidos cada vez mais estudos científicos que pretendem determinar quais as espécies e os compostos que possuem essa atividade.

Este trabalho pretendia avaliar a atividade anti-inflamatória de extratos de *Pterospartum tridentatum*, conhecida como Carqueja, através da determinação da inibição de uma das principais enzimas envolvidas na cascata inflamatória, a 5-lipoxigenase. Por ser um arbusto de origem autóctone, crescendo principalmente no oeste da Península Ibérica, o número de estudos desenvolvido relativamente a esta espécie é ainda muito reduzido.

Devido à inexistência de estudos que avaliem especificamente a capacidade dos extratos de *Pterospartum tridentatum* para inibirem a enzima 5-LOX foi necessário realizar uma análise exaustiva de vários estudos de inibição da enzima da 5-LOX, sendo implementado um procedimento para a realização de um ensaio espectrofotométrico e de um ensaio colorimétrico (ensaio FOX). A metodologia foi implementada em laboratório, tendo sido realizadas diversas alterações nos procedimentos estabelecidos inicialmente de forma a otimizar os métodos.

Após análise dos resultados obtidos para o ensaio espectrofotométrico foi possível concluir que a capacidade de inibitória dos extratos de *Pterospartum tridentatum* é semelhante à do NDGA, um potente inibidor utilizado em diversos estudos de inibição da enzima 5-LOX. Contudo, devido aos elevados níveis de % de inibição enzimática foi impossível calcular a IC50 para cada um dos extratos. Foi também possível concluir que o extrato de Caules e Folhas possui maior capacidade inibitória que o extrato de Flores. Estes resultados não estão de acordo com o que se encontra descrito na literatura para estes extratos [33], que indica a existência de uma maior quantidade de flavonóides nas flores de *Pterospartum tridentatum*, compostos referidos como possuindo propriedades anti-inflamatórias. Posto isto, pode-se justificar os resultados obtidos pela relação existente entre a concentração do extrato e respetiva capacidade inibitória, pelo que provavelmente a capacidade inibitória do extrato de flores de *Pterospartum tridentatum* será mais evidente numa outra faixa de concentrações. Outra explicação, seria a existência de outros compostos não flavonóides responsáveis por esta atividade anti-inflamatória.

Os resultados obtidos a partir do ensaio FOX vêm confirmar as conclusões do ensaio espectrofotométrico. Através deste ensaio colorimétrico foi possível concluir que, tal como o NDGA, os extratos de Caules e Folhas e Flores têm capacidade de diminuir a velocidade inicial da atividade enzimática da enzima 5-LOX, sendo esta influência mais evidente para as concentrações de 10 mg/mL e de 2 mg/mL, respetivamente, e não de uma maneira concentração-dependente, como seria de esperar, provavelmente devido ao erro experimental que poderá ter ocorrido durante a preparação da amostra de 2mg/mL de extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*.

Assim, seria necessário realizar ainda mais ensaios de forma a confirmar a metodologia usada e, numa fase posterior, separar e isolar os diversos compostos extraídos a partir da Carqueja, de forma a verificar qual(quais) o(s) responsável(véis) pelas propriedades anti-inflamatórias deste arbusto, verificando se esta atividade se mantém nos compostos isolados.

Referências Bibliográficas - Parte I

1. Mattson, C., *Essentials of Patophysiology*. 2003.
2. Rang and Dale, *Pharmacology*. 6ª ed. Elsevier. 2003. Ch.13.
3. Yoon, J.H. and S.J. Baek, *Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties*. Yonsei Med J, 2005. **46**(5): p. 585-96.
4. Gossiau, A., et al., *The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity*. Mol Nutr Food Res, 2011. **55**(1): p. 74-82.
5. Kim, H.P., et al., *Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms*. J Pharmacol Sci, 2004. **96**(3): p. 229-45.
6. Miguel, M.G., *Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review*. Molecules, 2010. **15**(12): p. 9252-87.
7. Fiorucci, S., et al., *Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?* Biochem Pharmacol, 2001. **62**(11): p. 1433-8.
8. Butovich, I.A. and S.M. Lukyanova, *Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenases by linoleyl hydroxamic acid: comparative in vitro studies*. J Lipid Res, 2008. **49**(6): p. 1284-94.
9. Goetzl, E.J., S. An, and W.L. Smith, *Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases*. FASEB J, 1995. **9**(11): p. 1051-8.
10. Prasad, N.S., et al., *Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2004. **70**(6): p. 521-8.
11. Kilfeather, S., *5-lipoxygenase inhibitors for the treatment of COPD*. Chest, 2002. **121**(5 Suppl): p. 197S-200S.
12. Martel-Pelletier, J., et al., *Therapeutic role of dual inhibitors of 5-LOX and COX, selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(6): p. 501-9.
13. Werz, O., *Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin*. Planta Med, 2007. **73**(13): p. 1331-57.
14. Titos, E., et al., *Inhibition of 5-lipoxygenase induces cell growth arrest and apoptosis in rat Kupffer cells: implications for liver fibrosis*. FASEB J, 2003. **17**(12): p. 1745-7.
15. Hudson, N., et al., *Enhanced gastric mucosal leukotriene B4 synthesis in patients taking non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Gut, 1993. **34**(6): p. 742-7.
16. Costa, A.F., *Farmacognosia*. 5 ed, ed. F.C. Gulbenkian. Vol. II. 2002, Lisboa. 195-209.
17. Burnett, B.P., et al., *A medicinal extract of Scutellaria baicalensis and Acacia catechu acts as a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase to reduce inflammation*. J Med Food, 2007. **10**(3): p. 442-51.
18. Cunha, A., *Farmacognosia e Fitoquímica*. 1ª ed. Fundação Calouste Gulbenkian. 2005, Lisboa. 237-289.
19. Evans, W., *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15 ed. Saunders. 2000. 246, 323.
20. Wagner, H.B., S. , *Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas*. 2 ed, ed. Springer. 1996. 195, 204-209.
21. Middleton, E., Jr., C. Kandaswami, and T.C. Theoharides, *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(4): p. 673-751.
22. Paulo, A., et al., *The opposing effects of the flavonoids isoquercitrin and sissotrin, isolated from Pterospartum tridentatum, on oral glucose tolerance in rats*. Phytother Res, 2008. **22**(4): p. 539-43.
23. Costa, J.C.H., J.; Monteiro-Henriques, T.; Neto, C.; Aguiar, C., *Notas do Herbário (LISFA) Fasc. XXVI*. Silva Lusitana, 2008. **16**(1): p. 123-127.

24. Vitor, R.F., et al., *Flavonoids of an extract of Pterospartum tridentatum showing endothelial protection against oxidative injury*. J Ethnopharmacol, 2004. **93**(2-3): p. 363-70.
25. Grosso, A.C.M., M. C.; Ganço, L.; Pereira, A.L.; Teixeira, G.; Lavado, J.; Figueiredo, A.; Barroso, J.; Pedro, L., *Essential oil composition of Pterospartum tridentatum grown in Portugal*. Food Chemistry, 2007. **102**: p. 1083-1088.
26. Castroviejo, S., *Flora ibérica: plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/07_10%20Pterospartum.pdf (consultado a 16-02-12): Madrid: Real Jardín Botánico. p. 133-137.
27. Ferreira, S., et al., *Bioethanol from the Portuguese forest residue Pterospartum tridentatum - An evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation*. Bioresour Technol, 2010.
28. Carvalho, A., R. Valverde, and M. Pardo de Santayana, *Etnobotánica del Parque Natural de Montesinho: plantas, tradición y saber popular en un territorio del nordeste de Portugal*. <http://hdl.handle.net/10198/689> 2005, Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
29. Chaves, A., *Viva melhor com as plantas medicinais*. 5ª edição. 2008, Lisboa: Edições Une. 113.
30. Camejo-Rodrigues, J., et al., *An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of "Serra de Sao Mamede" (Portugal)*. J Ethnopharmacol, 2003. **89**(2-3): p. 199-209.
31. Carvalho, A.F., M.; Pardo de Santayana, M.; Morales, R., *Etnobotânica de algumas espécies arbóreas e arbustivas do Parque Natural de Montesinho*, Escola Superior Agrária de Bragança <http://www.esac.pt/cernas/cfn5/docs/T5-67.pdf> (consultado a 15-02-12).
32. Novais, M.H., et al., *Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)*. J Ethnopharmacol, 2004. **93**(2-3): p. 183-95.
33. Luís, A., F. Domingues, and A. Duarte, *Bioactive compounds, RT-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some portuguese shrub species extracts*. Natural Product Communications, 2011. **6**(12): p. 1863-1872.
34. Luís, A., et al., *Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: Pterospartum tridentatum, Cytisus scoparius and Erica spp.* Journal of Medicinal Plants Research, 2009. **3**(11): p. 886-893.
35. Baylac, S. and P. Racine, *Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants*. The International Journal of Aromatherapy, 2004(14): p. 179-182.
36. Braga, P.C., et al., *Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase*. Pharmacology, 2006. **77**(3): p. 130-6.
37. Loizzo, M.R., et al., *Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of Origanum ehrenbergii Bois and Origanum syriacum L. essential oils*. Food Chemistry, 2009(117): p. 174-180.
38. Lee, S., et al., *Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages*. Phytother Res, 2008. **22**(11): p. 1552-6.
39. Comalada, M., et al., *Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(8): p. 1010-21.
40. Blay, M., et al., *Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation*. J Pharm Biomed Anal, 2010. **51**(2): p. 382-90.
41. Ryu, K.H., et al., *Anti-inflammatory and analgesic activities of SKLJ, a highly purified and injectable herbal extract of Lonicera japonica*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(10): p. 2022-8.

42. Park, H.H., et al., *Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells*. Arch Pharm Res, 2008. **31**(10): p. 1303-11.
43. Kang, J.L., et al., *Genistein prevents nuclear factor-kappa B activation and acute lung injury induced by lipopolysaccharide*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(12): p. 2206-12.
44. Vicentini, F.T., et al., *Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway*. J Dermatol Sci, 2011. **61**(3): p. 162-8.
45. Sosa, S., et al., *Extracts and constituents of Lavandula multifida with topical anti-inflammatory activity*. Phytomedicine, 2005. **12**(4): p. 271-7.
46. Lee, E.J., et al., *Phenolic constituents from the flower buds of Lonicera japonica and their 5-lipoxygenase inhibitory activities*. Food Chemistry, 2010. **120**: p. 134-139.
47. Loke, W.M., et al., *Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity*. Biochemical Pharmacology, 2008. **75**: p. 1045-1053.
48. Chung, S.W., et al., *Activation of 5-lipoxygenase and NF-kappa B in the action of acenaphthenequinone by modulation of oxidative stress*. Toxicol Sci, 2008. **101**(1): p. 152-8.
49. Titos, E., et al., *Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein abrogates experimental liver injury: role of Kupffer cells*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(4): p. 871-8.
50. Racine, P. and S. Baylac, *Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts*. The International Journal of Aromatherapy, 2003. **13**: p. 138-142.
51. Albano, S.M. and M.G. Miguel, *Biological activities of extracts of plants grown in Portugal*. Industrial Crops and Products, 2011. **33**: p. 338-343.
52. Kamatou, G.P., et al., *The in vitro pharmacological activities and a chemical investigation of three South African Salvia species*. J Ethnopharmacol, 2005. **102**(3): p. 382-90.
53. Pinto, M.D.C., et al., *Determination of lipoxygenase activity in plant extracts using a modified ferrous oxidation-xylene orange assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. **55**: p. 5956-5959.
54. Salas, J.J., et al., *Lipoxygenase activity in olive (Olea europaea) fruit*. JAOCS, 1999. **76**.
55. Waslidge, N.B. and D.J. Hayes, *A colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity suitable for use in a high throughput assay format*. Anal Biochem, 1995. **231**(2): p. 354-8.
56. Anthon, G.E. and D.M. Barrett, *Colorimetric method for the determination of lipoxygenase activity*. J Agric Food Chem, 2001. **49**(1): p. 32-7.
57. Cho, Y.S., et al., *Application of the ferrous oxidation-xylene orange assay for the screening of 5-lipoxygenase inhibitors*. Anal Biochem, 2006. **351**(1): p. 62-8.
58. Aharony, D. and R.L. Stein, *Kinetic mechanism of guinea pig neutrophil 5-lipoxygenase*. J Biol Chem, 1986. **261**(25): p. 11512-9.
59. Ochi, K., et al., *Arachidonate 5-lipoxygenase of guinea pig peritoneal polymorphonuclear leukocytes. Activation by adenosine 5'-triphosphate*. J Biol Chem, 1983. **258**(9): p. 5754-8.
60. Kanamoto, H., M. Takemura, and K. Ohyama, *Detection of 5-lipoxygenase activity in the liverwort Marchantia polymorpha L.* Biosci Biotechnol Biochem, 2009. **73**(11): p. 2549-51.
61. Hernandez, V., et al., *Effects of naturally occurring dihydroflavonols from Inula viscosa on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism*. Life Sci, 2007. **81**(6): p. 480-8.

Anexos - Parte I

As absorvâncias registadas para cada uma das concentrações de NDGA e dos extratos estão representadas na tabela seguinte:

Tabela A. Absorvâncias registadas a 234 nm para cada uma das amostras em análise

Concentração da amostra (mg/mL)	Absorvâncias		
	NDGA	Caules e folhas	Flores
0,5	1,149	1,108	1,089
1	1,182	1,13	1,109
2	1,252	1,182	1,194
5	1,557	1,268	1,288
10	1,901	1,608	1,423

A percentagem de inibição da atividade enzimática é calculada por comparação com o controlo negativo através da seguinte fórmula, onde A_0 corresponde à absorvância do controlo negativo e A_1 da amostra a testar:

$$\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

O valor de absorvância obtido para o controlo negativo foi de 0,087. Uma vez que os valores das absorvâncias são >1 , isto é, não respeitam a lei de Lambert-Beer, para calcular a % de inibição foi necessário utilizar o módulo da fórmula acima descrita. Posto isto, obtiveram-se as % de inibição enzimática descritas na tabela seguinte:

Tabela B. % de Inibição enzimática calculada para cada uma das concentrações de cada amostra em análise

Concentração da amostra (mg/mL)	% Inibição enzimática		
	NDGA	Caules e Folhas	Flores
0,5	92,4	92,1	92
1	92,6	92,3	92,2
2	93,1	92,6	92,7
5	94,4	93,1	93,2
10	95,4	94,6	93,9

Os valores de absorvância obtidos ao longo dos 12 minutos de medição para cada uma das concentrações das várias amostras estão descritos nas seguintes tabelas. Os valores de absorvância descritos para o NDGA resultam da média dos valores obtidos nos três ensaios que foram realizados.

Tabela C. Média dos valores de absorvâncias medidos ao longo de 12 minutos para as concentrações de 0,5, 1, 2, 5 e 10 mg/mL de NDGA

Tempo (min.)	Concentração de NDGA (mg/mL)				
	0,5	1	2	5	10
2	0,222	0,244	0,230	0,191	0,177
4	0,361	0,386	0,369	0,335	0,318
6	0,431	0,46	0,437	0,408	0,389
8	0,475	0,504	0,481	0,450	0,428
10	0,501	0,533	0,524	0,479	0,451
12	0,524	0,554	0,545	0,497	0,469

Tabela D. Média dos valores de absorvâncias medidos ao longo de 12 minutos para as concentrações de 0,5, 1, 2, 5 e 10 mg/mL de extrato de Caules e Folhas de *Pterospartum tridentatum*

Tempo (min.)	Concentração do extrato de Caules e Folhas (mg/mL)				
	0,5	1	2	5	10
2	0,198	0,205	0,222	0,230	0,196
4	0,335	0,347	0,360	0,380	0,302
6	0,414	0,415	0,429	0,470	0,347
8	0,461	0,479	0,472	0,518	0,397
10	0,492	0,511	0,500	0,575	0,429
12	0,514	0,531	0,503	0,598	0,462

Tabela E. Média dos valores de absorvâncias medidos ao longo de 12 minutos para as concentrações de 0,5, 1, 2, 5 e 10 mg/mL de extrato de Flores de *Pterospartum tridentatum*

Tempo (min.)	Concentração do extrato de Flores (mg/mL)				
	0,5	1	2	5	10
2	0,048	0,091	0,124	0,141	0,126
4	0,178	0,233	0,239	0,280	0,257
6	0,247	0,306	0,300	0,353	0,327
8	0,290	0,349	0,344	0,401	0,371
10	0,314	0,381	0,369	0,435	0,404
12	0,332	0,403	0,392	0,455	0,420

*“O papel do Farmacêutico no mundo é tão nobre quão vital.
O Farmacêutico representa o órgão de ligação entre a medicina
e a humanidade sofredora. É o atento guardião do arsenal
de armas com que o Médico combate às doenças. É quem atende
às requisições a qualquer hora do dia ou da noite.
O lema do Farmacêutico é o mesmo do soldado: servir. Um serve à
pátria; outro serve à humanidade, sem nenhuma discriminação de cor ou raça.”*

Monteiro Lobato

