



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRIELA MUNIZ DE ALBUQUERQUE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTIINFLAMATÓRIA DE DOIS DITERPENOS E EXTRATOS DA
CASCA DO CAULE DE *Xylopia langsdorffiana* (ANNONACEAE)**

MACEIÓ - AL

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GABRIELA MUNIZ DE ALBUQUERQUE MELO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTIINFLAMATÓRIA DE DOIS DITERPENOS E EXTRATOS DA
CASCA DO CAULE DE *Xylopiã langsdorffiana* (ANNONACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, para a obtenção do título de
Mestre em Ciências da Saúde.

ORIENTADORA: PROF^a DRA. MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA

MACEIÓ - AL

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- M528a Melo, Gabriela Muniz de Albuquerque.
Avaliação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de dois diterpenos e extratos da casca do caule de *Xylopiá langsdorffiana* (Annonaceae) / Gabriela Muniz de Albuquerque Melo, 2009.
94 f. : il.
- Orientadora: Magda Suzana Alexandre Moreira.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.
- Bibliografia: f. 81-94.
1. *Xylopiá langsdorffiana*. 2. Atividade antinociceptiva. 3. Atividade antiinflamatória. 4. Extrato etanólico. 5. Extrato clorofórmico. 6. Ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico. 7. Ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico. I. Título.

CDU: 582.677.5



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Gabriela Muniz de Albuquerque Melo, intitulada: "Avaliação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva de dois diterpenos e extratos a casca do caule de *Xylopiá langsdorffiana* St-Hil & Tul (*Annonaceae*)", orientada pela Profª Drª Magna Susana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 23 de março de 2009

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata aprovada

Banca Examinadora:

Profª. Drª. Magna Susana Alexandre Moreira – Orientadora(ICBS – UFAL)

Profª. Drª. Célia Akemi Kanashiro– Titular (UNCISAL)

Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto – Titular(ICBS- UFAL)

Profª Drª Éurica Adélia Nogueira Ribeiro – Titular (ESENFAR – UFAL)

Ao meu avô Jayme Gomes de Albuquerque Melo

AGRADECIMENTOS

A DEUS, meu Pai amado, por tudo, pois se cheguei até aqui foi pela sua graça. A JESUS CRISTO que me livrou da morte, pelo seu imenso amor por mim. Ao ESPÍRITO SANTO, por andar comigo em todos os momentos me guardando e guiando meus passos.

Aos meus pais e irmãs por todo apoio, amor e dedicação.

A minha orientadora Professora Magna, que durante esses mais de três anos de convivência foi um exemplo de determinação e me mostrou que mesmo com toda dificuldade é possível fazer ciência, pelo seu apoio, amizade e por tudo que fez e tem feito por mim. Muito obrigada professora!

Ao meu noivo Reidson, por todo carinho, cuidado, amor e dedicação. Te amo muito!

A minha amiga Yolanda (trapinho) por tudo que passamos durante o curso, pela sua amizade e dedicação, amo você.

A todos os amigos do LaFI: Aline, Anne, Carol, Luíz, Mariana, Walfrido, Anansa, Diogo, Everton e Thays (também te amo muito, não fique com ciúmes da Yolanda); e a Eliane, por todo carinho e apoio, adoro todos vocês.

A todos os amigos do curso de mestrado, em especial, Adalberto, Aryanna, Ângela, Benísio, Círia, Daniela, Juliana, Juliane, Luciano, Paula e Socorro por todos os momentos especiais que passamos juntos e pela amizade firmada.

A CAPES e a FAPEAL pelo apoio financeiro

Aos professores, Marcelo Sobral da Silva e Josean Fechine Tavares do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica - UFPB pelos extratos e substâncias cedidas.

A todos que fazem parte do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, o meu muito obrigada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria, o homem que obtém entendimento, pois a sabedoria é mais proveitosa que a prata e rende mais que o ouro. É mais preciosa que rubis; nada que você possa desejar se compara com ela.”

Provérbios 3.13-15

RESUMO

Este trabalho descreve os resultados do estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória dos extratos etanólico (EEt) e clorofórmico (ECl) obtidos da casca do caule de *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul, bem como dos diterpenos ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico (XL) e ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico (XLC) isolados destes, respectivamente. As substâncias (XL e XLC, 300 μ mol/Kg, i.p.) e extratos (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) inibiram de forma significativa o número de contorções abdominais quando comparados ao controle. Para avaliação da potência e eficácia das substâncias XL, XLC e dipirona (300 μ mol/Kg, 100 μ mol/Kg, 30 μ mol/Kg, 10 μ mol/Kg e 1 μ mol/Kg, i.p.) foi calculada, a dose que inibe 50 por cento da resposta (DI₅₀). A DI₅₀ da XL foi 42,8 μ mol/Kg, a da XLC foi de 17,41 μ mol/Kg, já a dipirona apresentou uma DI₅₀ de 14,68 μ mol/Kg. Comparando-se a DI₅₀ da XL, XLC e dipirona pode-se observar que a XLC apresentou uma potência maior que a da XL, sendo o valor da sua DI₅₀ mais próximo ao da dipirona. A XLC também apresentou maior eficácia que a XL. No ensaio de nocicepção induzida por formalina, as substâncias XL e XLC (100 μ mol/Kg, i.p.) e os extratos (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) induziram significativa inibição no tempo de lambida tanto na fase neurogênica (41,52%, 33,69%, 40,12%, 79,4%, de inibição, respectivamente), quanto na fase inflamatória (44,1%, 63,9%, 62,7% e 83,7% de inibição, respectivamente) quando comparadas ao controle. As substâncias (XL e XLC, 100 μ mol/Kg, i.p.) bem como os extratos (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) não foram ativos no ensaio da placa quente, que visa à avaliação da atividade antinociceptiva central. Utilizando o ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina, foi possível determinar que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de inibição do edema, entre a indometacina (100 μ mol/Kg, i.p.), fármaco padrão utilizado no ensaio, e os diterpenos XL e XLC em suas diferentes concentrações (300, 100, 30, 1 e 0,3 μ mol/Kg), (exceto XLC na concentração de 0,3 μ mol/Kg). XL e XLC (100 μ mol/Kg, i.p.), bem como os extratos (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) reduziram a migração celular induzida por Zymosan A de forma estatisticamente significativa. Estas substâncias e extratos induziram uma redução da migração celular de 36,40%, 49,51%, 42,51%, 51,97%, respectivamente. A substância XLC não foi eficiente ao inibir o edema da artrite reumatóide. Em modelo de toxicidade aguda, XL e XLC não demonstraram toxicidade, enquanto o oposto ocorreu pela administração dos extratos. Nossos resultados permite inferir que EEt e ECl obtidos da casca do caule de *X. langsdorffiana*, como seus isolados XL e XLC apresentam atividade antinociceptiva e antiinflamatória, sendo estas descritas pela primeira para essas substâncias e extratos.

Palavras-chave: Antinociceptiva, antiinflamatória, extrato etanólico, extrato clorofórmico, ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico, ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico e *Xylopia langsdorffiana*.

ABSTRACT

This study describes the results of the study of the antinociceptive and antiinflammatory activity of ethanolic extract (EEt) and chloroform (ECl) from *Xylopi* *langsдорffiana* St-Hil & Tul and the diterpenes acid labda-8(17),12*E*,14-trien-18-oic (XL) and acid ent-7*α*-acetoxytrachyloban-18-oic (XLC) of these isolates, respectively. Substances (XL and XLC, 300 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p) and extracts (EEt and ECl, 100 mg/Kg, i.p.) inhibited significantly the number of abdominal writhes when compared to control. To evaluate the power and effectiveness of the substances XL, XLC and dipyrone (300 $\mu\text{mol/Kg}$ 100 $\mu\text{mol/Kg}$, 30 $\mu\text{mol/Kg}$, 10 $\mu\text{mol/Kg}$ e 1 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) was calculated, the dose that inhibits 50 percent of the response (DI_{50}). The DI_{50} of XL was 42,8 $\mu\text{mol/Kg}$, that of XLC was 17,41 $\mu\text{mol/Kg}$, dipyrone already submitted a DI_{50} of 14,68 $\mu\text{mol/Kg}$. Comparing the DI_{50} of XL, XLC and dipyrone may be observed that the XLC had a power greater than the XL, and the value of DI_{50} nearest the dipyrone. The xlc also showed that the efficiency XL In the test of nociception induced by formalin, the substances XL and XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) and extracts (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) induced significant inhibition of licking time in both the neurogenic phase (41,52%, 33,69%, 40,12%, 79,4%, of inhibition, respectively), as in the inflammatory phase (44,1%, 63,9%, 62,7% e 83,7%, of inhibition, respectively) compared to the control. Substances (XL e XLC, 100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p) and the extracts (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.) were not active in hot plate test, which aims to assess the central antinociceptive activity. Using the test of ear edema induced by capsaicin, it was possible to determine that there was no statistically significant difference in percentage of inhibition of edema between the indomethacin (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), used in standard drug test, and diterpenes XL and XLC in different concentrations (300, 100, 30, 1 e 0,3 $\mu\text{mol/Kg}$), (XLC trachylobano except at a concentration of 0,3 $\mu\text{mol/Kg}$). XL and XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), and the extract (EEt e ECl, 100 mg/Kg, i.p.), reduced the cell migration induced by Zymosan A, a statistically significant way. These substances and extracts induced a reduction in cell migration of 36,40%, 49,51%, 42,51%, 51,97%, respectively. XLC was not efficient to inhibit the progression of rheumatoid arthritis. In the model of acute toxicity, XL and XLC, were not toxic, while the opposite occurred for the administration of the extracts. Our results we infer that EEt and ECl from *Xylopi* *langsдорffiana* as its isolated XLC and XL have antinociceptive and antiinflammatory activity, being described by the first for these substances and extracts.

Keywords: antinociceptive, antiinflammatory, ethanolic extract, chloroform extract, acid labda-8(17),12*E*,14-trien-18-oic, acid ent-7*α*-acetoxytrachyloban-18-oic and *Xylopi* *langsдорffiana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática dos neurônios das vias ascendentes viscerais sinapses medulares e talâmicas (via espinotalâmica).....	23
Figura 2- Mediadores envolvidos na nocicepção.....	26
Figura 3- Metabolismo do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação.....	34
Figura 4- Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo representada em vermelho.....	45
Figura 5- Fotos de <i>Xylopia langsdorffiana</i> em seu habitat. a) árvore completa, b) detalhe dos frutos e c) detalhe das folhas.....	49
Figura 6- Estruturas moleculares dos diterpenos isolados de <i>X. langsdorffiana</i> . A: α ent-7 - ácido de acetoxytrachyloban-18-oic (trachylobano - XLC); B: ácido 8(17),12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano – XL).....	50
Figura 7- Molécula fundamental do isopreno.....	52
Figura 8- Efeito da dipirona (100 mg/Kg, i.p.), EEt e ECl (100 mg/Kg, i.p.) e dos seus purificados, XL e XLC (300 μ mol/Kg, i.p.), em ensaio de nocicepção induzida por ácido acético. (**P<0,01 foi considerado significativo ao nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).....	65
Figura 9- Curva dose – resposta da dipirona, XL e XLC em ensaio de nocicepção induzida por ácido acético (*P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA).....	68

Figura 10- Efeito da indometacina (100 µmol/Kg, i.p.), dos EEt e ECl (100 mg/Kg, i.p.), e dos diterpenos XL e XLC (100 µmol/Kg, i.p.) em ensaio de nocicepção induzida por formalina. (**P<0,01 foi considerado significativo ao nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).....	69
Figura 11- Efeito das substâncias XL, XLC e indometacina (100 µmol/Kg, i.p.) em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. (**P<0,01, *P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet, quando comparados com o controle positivo – animal tratado com capsaicina).....	74
Figura 12- Efeito das substâncias XL e XLC (100 µmol/Kg, i.p.) e capsazepina (0,2 mg/orelha) em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. (**P<0,01, *P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet, quando comparados com o controle positivo – animal tratado com capsaicina ou teste t de Student).....	75
Figura 13- Efeito de XL e XLC (100 µmol/Kg, i.p.), EEt e ECl (100 mg/Kg, i.p.) e indometacina (100 µmol/Kg, i.p.) em ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. (**P<0,01 foi considerado significativo no nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).....	78
Figura 14- Pata do animal Controle–animal normal (A) e animal artrítico-administrado com adjuvante (B) após 14 dias de indução da síndrome, → eritema e edema na pata direita do animal artrítico causados pela administração do adjuvante completo de Freud.....	80

Figura 15- Efeito da XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) e talidomida (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), em ensaio artrite induzida por adjuvante completo de Freund (* $P < 0,05$ foi considerado significativo no nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).....80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito das substâncias XL e XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), EEt e ECl (100 mg/Kg, i.p.) e morfina (15 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) no ensaio da placa quente.....	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
EEt	Extrato etanólico
ECI	Extrato clrofórmico
LTF	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica –UFPB
CGRP	Peptídio relacionado ao gen da calcitonina
Db-GMPc	Dibutiril guanosina monofosfato cíclico
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BK	Bradicinina
Bk1	Receptor para bradicinina 1
Bk2	Receptor para bradicinina 2
Bk3	Receptor para bradicinina 3
Bk4	Receptor para bradicinina 4
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PAF	Fator ativador de plaquetas
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-8	Interleucina-8
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10

iNOS	Óxido nítrico-sintase induzível
i.p	Intraperitoneal
LT	Leucotrieno
LTB₄	Leucotrieno B ₄
LX	Lipoxina
NF-κB	Fator nuclear de transcrição kappa B
TLR	Receptor Toll
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização mundial da Saúde
AA	Ácido araquidônico
PG	Prostagladina
PGD₂	Prostaglandina D ₂
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGI₂	Prostaciclina I ₂
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C
SP	Substância P
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TVRP1	Receptor vanilóide 1
ASIC	Canal iônico ativado pelo estiramento
TX	Tromboxano
μ	Micro

AR Artrite Reumatóide

AAS Ácido acetil-salicílico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Dor	19
1.1.1. Classificação da Dor.....	20
1.1.2. Mecanismos Neurais da Dor.....	21
1.1.3. Mediadores da Dor.....	24
1.2. O Processo Inflamatório	27
1.2.1. Resposta Inflamatória Aguda.....	28
1.2.1.1. Mediadores Químicos da Inflamação.....	30
1.2.2. Resposta Inflamatória Crônica: A Artrite Reumatóide.....	36
1.3. Produtos Naturais Como Fonte de Recursos Terapêuticos	40
1.4. Considerações Sobre a Família Annonaceae	44
1.5. Considerações Sobre o Gênero <i>Xylopi</i> L.	47
1.6. Considerações Sobre <i>Xylopi</i> <i>langsdorffiana</i> St-Hil & Tul	49
1.7. Metabólitos Secundários do Tipo Terpenóides	51
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo geral.....	56
2.2. Objetivos específicos.....	56
3. MATERIAL E MÉTODOS	57
3.1. Material botânico.....	58
3.2. Extratos e substâncias utilizadas.....	58
3.3. Animais.....	59

3.4. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	59
3.5. Ensaio de nocicepção induzido por formalina.....	60
3.6. Ensaio da Placa Quente.....	60
3.7. Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina.....	61
3.8. Ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.....	61
3.9. Ensaio de artrite induzida por Adjuvante completo de Freund.....	62
3.10. Toxicidade aguda.....	62
3.11. Análise Estatística.....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS.....	85

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOR

A dor é uma experiência complexa e de múltiplas dimensões, que geralmente se origina no sítio da lesão, sendo transmitida pelo sistema nervoso periférico, processada em diversos níveis do sistema nervoso central e, finalmente percebida no córtex cerebral (PRADO & DEL BEL, 1998). Pode ser definida, segundo o Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (I.A.S.P.), como uma sensação ou experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular potencial, real ou mesmo nenhuma lesão, embora ainda assim descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido (MILLAN, 1999).

A dor é uma das grandes preocupações da humanidade. Desde os primórdios do ser humano, conforme sugerem alguns registros gráficos da pré-história, o homem sempre procurou esclarecer as razões que justificassem a ocorrência de dor e os procedimentos destinados para seu controle. Estudos demonstram que a dor afeta os mais variados domínios da qualidade de vida humana, primariamente físicos e emocionais. O efeito depende da extensão, duração, intensidade, significado que a dor, bem como a doença relacionada, são características individuais (NIV & KREITLER, 2001).

1.1.1. Classificação da Dor

A dor pode ser basicamente classificada como: nociceptiva, neuropática e inflamatória. A dor nociceptiva ocorre por estimulação química ou física de terminações nervosas normais, podendo ser resultado de danos teciduais como inflamações, traumas, manobras invasivas ou isquemias. Os estímulos dolorosos nessas condições ocorrem devido à ativação de receptores sensoriais (terminações nervosas livres), que fazem a transdução dos sinais vindos do ambiente e levam as informações ao sistema nervoso central, através de neurônios intactos (RANG *et al.*, 2007).

Lesões periféricas ou centrais, tendo por causa doenças infecciosas, inflamatórias ou degenerativas, traumas físicos ou químicos entre outros estão relacionados com a dor neuropática. Possivelmente os mecanismos da dor neuropática e hiperalgesia secundária estão ligados a mudanças que ocorrem ao longo da fibra aferente primária, podendo ser, por exemplo, um traumatismo, então alterações nas estruturas responsáveis pelo íntegro funcionamento das vias de condução ou processamento, podem gerar dor por estímulos nocivos ou até espontânea (MILLAN, 1999).

Já a dor inflamatória é caracterizada normalmente pela presença de mediadores químicos que podem atuar diminuindo o limiar dos nociceptores, ativando os receptores ou ambos, dependendo do tipo de substância liberada o que caracteriza hiperalgesia. Esses receptores geralmente são polimodais sensíveis a estímulos químicos, térmicos e mecânicos. (FERREIRA, LORENZETTI & POOLE, 1993).

1.1.2. Mecanismos Neurais da Dor

Os receptores responsáveis pela captação de estímulos dolorosos estão em terminações nervosas livres, que são ramificações axônicas detentoras de um aparato responsável pela transformação de um estímulo doloroso em potencial de ação, que é conduzido através de uma fibra nervosa até o sistema nervoso central. Todo processo de captação, envio de informação, processamento e resposta de um estímulo doloroso é denominado nocicepção (MILLAN, 1999, BROOKS & TRACEY, 2005).

Esses receptores, denominados nociceptores, são continuidades de fibras aferentes sensitivas principalmente dos tipos A- δ e C, sendo essas aferências cutâneas diferenciadas pelo diâmetro e estrutura de seus axônios, o que interfere diretamente na velocidade de condução dessas fibras. As fibras C mais delgadas são amielínicas e conduzem a baixas velocidades, as fibras A- δ são consideradas fibras intermediárias de condução mais rápida, pois possuem uma fina camada de mielina e as fibras A- β são calibrosas possuindo uma espessa camada de mielina, o que possibilita essas fibras conduzir impulsos em altas velocidades (MILLAN, 1999; BROOKS & TRACEY, 2005).

Existem também fibras de alta condução relacionadas aos estímulos táteis, que são fibras do tipo A- α e A- γ . As fibras aferentes diferem na sensibilidade aos estímulos nociceptivos ou não, sendo em condições normais, as fibras do tipo A- δ e C as responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva (MILLAN, 1999, BROOKS & TRACEY, 2005). Com a ativação através de um estímulo nocivo, as fibras A- δ , dão início à fase primária da dor (fase rápida), ou dor aguda, e com a continuação do estímulo às fibras C se encarregam da segunda fase da dor, onde a mesma se manifesta de maneira lenta. Uma

grande variedade de receptores está acoplada a essas fibras, sendo eles sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos ou nocivos e existem também receptores denominados polimodais (MILLAN, 1999).

Os tecidos em quase que sua totalidade, são inervados por fibras aferentes que diferem suas propriedades a depender do tipo de tecido inervado (BESSON, 1999; MILLAN, 1999). O início do processo da dor se dá com a transdução do sinal mecânico, térmico, nocivo ou químico em um sinal elétrico de magnitude suficiente para poder ser conduzido através da fibra nervosa. Uma vez ultrapassando o limiar de disparo, o potencial de ação decursa pela fibra até chegar ao corno dorsal da medula espinhal, onde faz sinapse com neurônios de segunda ordem, em sua maioria na lâmina II. Os neurônios de segunda ordem cruzam contralateralmente a medula ascendendo pelo trato espinotalâmico. Dessa forma, suas fibras atingem locais específicos do tálamo, para que essa informação seja redistribuída para os locais mais nobres do processamento encefálico, chegando ao córtex somatossensorio (giro pós-central), de onde emana a sensação da dor, e/ou para o giro cingulado anterior que corresponde ao componente emocional da dor (**Figura 1**) (BASBAUM & JESSELL, 2004).

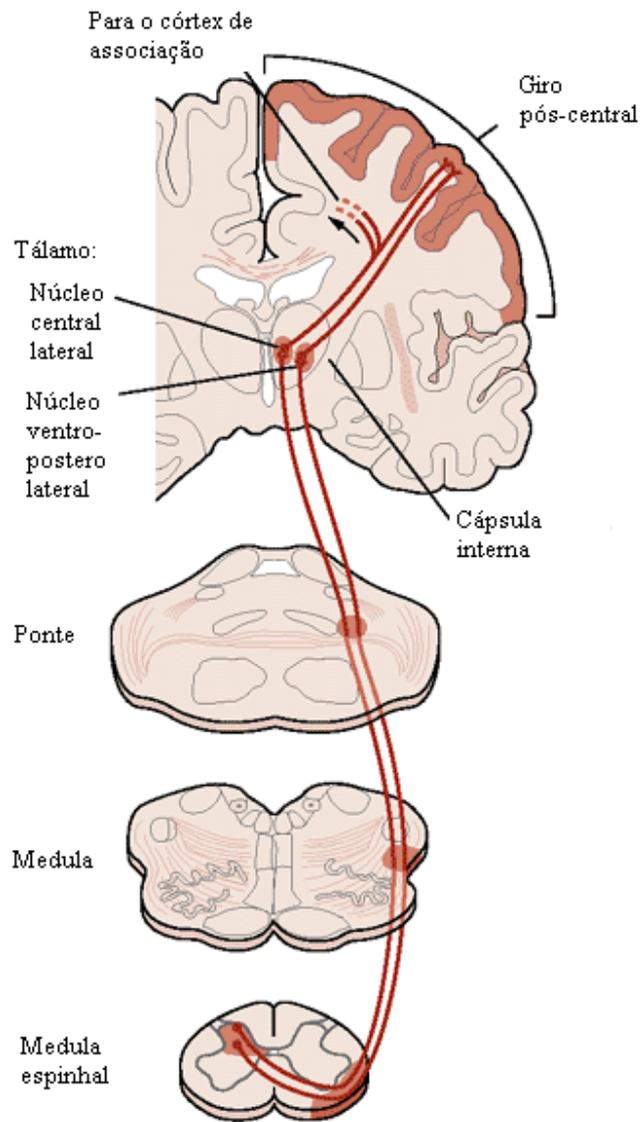


Figura 1- Representação esquemática dos neurônios das vias ascendentes viscerais e sinapses medulares e talâmicas (via espinotalâmica) (modificado de BASBAUM & JESSELL, 2004).

1.1.3. Mediadores da Dor

A sensibilização de nociceptores após lesão ou inflamação resulta da liberação de uma variedade de compostos químicos por células e tecidos danificados na vizinhança da lesão. Essas substâncias incluem a bradicinina, histamina, prostaglandinas, leucotrienos, acetilcolina, serotonina e substância P. Cada uma dessas substâncias origina-se de diferentes populações de células, mas todas atuam para reduzir o limiar de ativação dos nociceptores. Algumas, entretanto, também ativam nociceptores (BASBAUM & JESSELL, 2004).

O ATP, a acetilcolina e a serotonina são liberadas de células endoteliais e plaquetas danificadas e atuam sozinhas ou em conjunto para sensibilizar nociceptores através de outros agentes químicos, como prostaglandinas e bradicinina. O peptídeo bradicinina é um dos agentes mais ativos causadores de dor. Acredita-se que esse alto grau de atividade se deve a duas ações distintas: ativação direta das fibras A- δ e C e aumento da síntese e liberação de prostaglandinas pelas células vizinhas (BASBAUM & JESSELL, 2004).

O papel da bradicinina nas vias da dor é possível pela sua interação com quatro tipos de receptores Bk1, Bk2, Bk3 e Bk4 onde Bk1 e Bk2, merecem destaque devido a sua capacidade de ativar diretamente fibras aferentes que levam informação nociceptiva, sendo revelado por estudos posteriores o envolvimento desses receptores com a sensibilização do nociceptor (CORREIA & CALIXTO, 1993).

A histamina é uma das principais substâncias liberadas pelos mastócitos, sendo este processo realizado através de exocitose durante reações alérgicas ou inflamatórias,

encontrada também em basófilos e em plaquetas. Exerce papel importante no processo da dor inflamatória por ativar diretamente os nociceptores polimodais, contudo, a sua ação está muito mais associada à sensação de prurido (FERREIRA, LORENZETTI & CAMPOS 1990). Os neurônios nociceptivos primários regulam seu ambiente químico através de mediadores químicos que são sintetizados no corpo celular e são então transportados para o terminal periférico sendo estocados e liberados sob despolarização do terminal. A lesão induz a liberação de dois peptídeos neuroativos, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), de terminações sensitivas nociceptivas. Esses dois peptídeos contribuem para o aumento de edema, atuando diretamente sobre as vênulas para produzir vasodilatação (inflamação neurogênica). Eles também contribuem para a hiperalgesia pela liberação de histamina dos mastócitos (**Figura 2**) (BASBAUM & JESSELL, 2004).

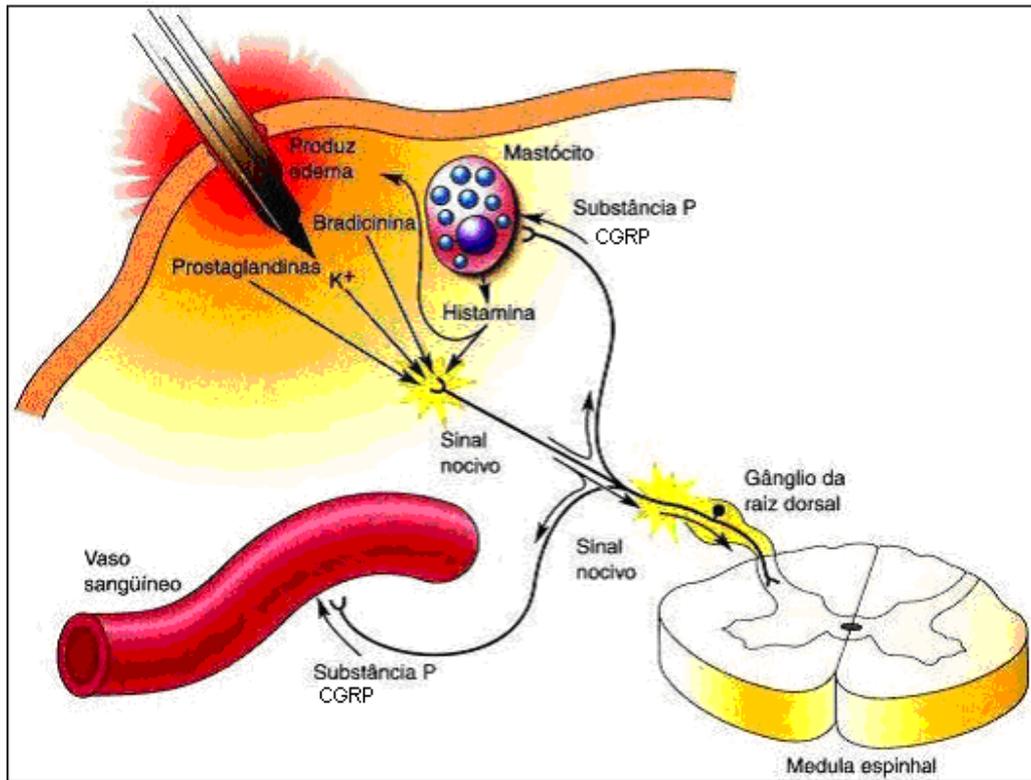


Figura 2- Mediadores envolvidos na nocicepção (modificado de BEAR, CONNORS & PARADISO, 2002).

1.2. O PROCESSO INFLAMATÓRIO

O estudo da inflamação é antigo tendo o escritor romano Celsus (30 a.C. – 38 d.C.) descrito os quatro sinais cardeais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Um quinto sinal clínico da inflamação perda da função, foi acrescentado por Virchow (1858). John Hunter (1728 – 1793) compreendia a inflamação como um processo benéfico e de proteção, sem o qual animais e seres humanos não poderiam sobreviver aos seus inimigos. Uma das primeiras descrições microscópicas da inflamação foi realizada por Julius Cohnheim (1839 – 1884), o primeiro pesquisador a descrever a seqüência de eventos vasculares, que são dilatação, estase do sangue, marginalização e migração dos leucócitos (COLLINS, 2000).

A resposta inflamatória consiste em uma série de eventos celulares e humorais desencadeados por um tecido vivo vascularizado, na tentativa de combater a agressão de um agente estranho, em geral exógeno ao organismo. Essa reação pode resultar em cura e eliminação do patógeno, com ou sem seqüelas, como cicatrização e fibrose, ou evoluir para um processo crônico, se a substância nociva persistir. Em certas ocasiões, o agente agressor desencadeador da inflamação pode ser endógeno, como no caso dos distúrbios auto-imunes, situação na qual a resposta inflamatória pode ser prejudicial (RANG *et al.*, 2007).

A inflamação pode ser didaticamente dividida em duas fases: aguda e crônica. A inflamação aguda é de duração relativamente curta, podendo durar minutos, horas ou mesmo alguns dias. Sua principal característica é a presença de exsudato rico em proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos, principalmente os neutrófilos. A inflamação crônica tem duração mais longa e está relacionada com algumas alterações histológicas,

como a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (COLLINS, 2000; RANG *et al.*, 2007).

1.2.1. Resposta Inflamatória Aguda

A inflamação aguda é a resposta imediata e precoce a um agente nocivo e possui três componentes principais: alterações do calibre vascular; alterações estruturais da microvasculatura, que permitem que as proteínas plasmáticas e leucócitos deixem a circulação; migração dos leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no foco da lesão. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por um aumento do fluxo sanguíneo para a área lesada, resultante principalmente de dilatação arteriolar e abertura dos leitos capilares. O aumento da permeabilidade vascular leva ao acúmulo de líquido extravascular rico em proteína, o qual forma o exsudato. As proteínas plasmáticas deixam os vasos por lesão direta das células endoteliais ou mais comumente por através das junções alargadas entre as células endoteliais das vênulas (COLLINS, 2000).

A seqüência de eventos que envolvem o extravasamento de leucócitos pode ser dividida nas seguintes etapas: marginação, rolagem e aderência (luz do vaso); transmigração através do endotélio; migração nos tecidos intersticiais em direção a um estímulo quimiotático. No sangue que flui normalmente nas vênulas, os eritrócitos são confinados a uma coluna axial central, deslocando os leucócitos em direção a parede do vaso. Como o fluxo sanguíneo se torna mais lento no início da inflamação, mais leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial, processo denominado marginação. Subseqüentemente, os leucócitos rolam lentamente ao longo do endotélio e

aderem transitoriamente, por fim repousam em algum ponto ao qual eles aderem firmemente. Após aderência firme, inserem pseudópodes nas junções entre as células endoteliais e atravessam a membrana basal escapando para o espaço extravascular (COLLINS, 2000).

Após o extravasamento, leucócitos são atraídos para o sítio inflamatório por um processo de quimiotaxia, definido como uma locomoção orientada ao longo de um gradiente químico. Dentre as moléculas quimiotáticas primárias para neutrófilos, eosinófilos e monócitos destacam-se: produtos bacterianos; componentes do sistema do complemento (C5a e C3a), calicreína e ativador de plasminogênio; fibrinopeptídeos; produtos de degradação da fibrina; produtos da via da lipoxigenase, principalmente o leucotrieno B₄; fatores quimiotáticos para neutrófilos e eosinófilos liberados de mastócitos; fator quimiotático liberado de neutrófilo e citocinas, principalmente aquelas da família das quimiocinas (COLLINS, 2000, RANG *et al.*, 2007).

Segue-se a fagocitose do agente lesivo. Durante a quimiotaxia e fagocitose, os leucócitos ativados podem liberar metabolitos tóxicos e proteases no meio extracelular, potencialmente causando lesão tecidual. Essas reações do processo inflamatório são mediadas por diversas substâncias como, histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico e neuropeptídeos, que amplificam a resposta inflamatória (COLLINS, 2000, RANG *et al.*, 2007).

1.2.1.1. Mediadores Químicos da Inflamação

Os mediadores podem se originar de células ou do plasma. Os mediadores oriundos de células normalmente estão seqüestrados nos grânulos intracelulares (histamina nos grânulos dos mastócitos) ou são sintetizados originalmente em resposta a um estímulo (prostaglandinas, citocinas). As principais fontes celulares são plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos e mastócitos. As células mesenquimais (endotélio, músculo liso, fibroblastos) e a maioria dos epitélios também podem sintetizar alguns mediadores. Os mediadores oriundos do plasma (complemento) são encontrados em formas precursoras que devem ser ativadas, em geral por uma série de clivagens proteolíticas, a fim de adquirir suas propriedades biológicas. (COLLINS, 2000).

A histamina encontra-se amplamente distribuída nos tecidos, sendo a fonte mais rica os mastócitos, que estão normalmente presentes no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. Também é encontrada em basófilos e plaquetas. A histamina pré-formada está presente nos grânulos de mastócitos e é liberada por desgranulação dessas células em resposta a variados estímulos: lesão física ou traumatismo; reações imunes envolvendo a ligação dos anticorpos nos mastócitos, fragmentos do complemento denominados anafilatoxina (C3a e C5a), proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos, neuropeptídeos e citocinas. No ser humano a histamina causa dilatação das arteríolas e aumenta permeabilidade vascular das vênulas. É considerada o principal mediador da fase imediata de aumento da permeabilidade vascular, produzindo lacunas venulares. A histamina atua sobre a microcirculação principalmente através dos receptores H₁ (COLLINS, 2000; RANG *et al.*, 2007).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) um mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes às da histamina. Está presente nas plaquetas e células enterocromafins (seres humanos e roedores) e nos mastócitos (roedores). A liberação da serotonina das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina e complexo antígeno-anticorpo. A agregação e liberação plaquetária também é estimulada pelo fator de ativação plaquetária (PAF), proveniente dos mastócitos durante reações mediadas por IgE. A reação de liberação plaquetária resulta em aumento da permeabilidade durante reações imunológicas (COLLINS, 2000; RANG *et al.*, 2007).

A bradicinina (BK) é um cininogênio vasoativo de alto peso molecular que provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora resulta, em parte, da produção de PGI₂ e da liberação de óxido nítrico. Com base nas observações experimentais, a bradicinina é capaz de produzir muitos fenômenos que ocorrem na reação inflamatória: dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e espasmo da musculatura lisa, entretanto, o papel que desempenha na inflamação e na alergia ainda não foi claramente definido, porquanto seus efeitos com frequência fazem parte de uma complexa cascata de eventos que incluem outros mediadores (RANG *et al.*, 2007).

O óxido nítrico (NO) é produzido pela ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS), que ocorre numa isoforma endotelial, neuronal e induzível. As enzimas NO sintases são fundamentais para o controle da biossíntese de NO. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzível (iNOS ou NOS-II) expressa nos macrófagos e nas células de Kupffer, neutrófilos, fibroblatos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos, como microorganismos invasores, e duas formas denominadas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio. O NO possui ações principalmente pró-inflamatórias: trata-se de um potente vasodilatador, que aumenta

a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas. O NO ou compostos dele derivados exercem ação citotóxica contra bactérias, fungos, vírus e parasitas e acredita-se que o NO possa potencializar os mecanismos de defesa locais. Todavia quando produzido em excesso pode ser prejudicial para as células do hospedeiro, podendo levar a uma vasodilatação periférica maciça e a choque (COLLINS, 2000; RANG *et al.*, 2007).

Os neuropeptídeos liberados de neurônios sensitivos contribuem para as reações inflamatórias, constituindo o fenômeno conhecido como inflamação neurogênica. Os principais peptídeos envolvidos são a substância P, a neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). A substância P e a neurocinina A atuam sobre mastócitos, liberando histamina e outros mediadores, e produzem contração da musculatura lisa e secreção de muco. O CGPR é um potente vasodilatador. A inflamação neurogênica está implicada na patogenia de várias condições inflamatórias, incluindo a fase tardia da asma, rinite alérgica, doença intestinal inflamatória e alguns tipos de artrite (RANG *et al.*, 2007).

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídicos liberados por células do sistema imune. Foram identificadas mais de 100 citocinas, e a superfamília das citocinas inclui: as interleucinas, as quimiocinas, os interferons, os fatores de estimulação de colônias, os fatores de crescimento e os fatores de necrose tumoral. Além de suas próprias ações diretas sobre as células algumas citocinas induzem a formação de outras citocinas (constituindo uma cascata de amplificação), enquanto algumas induzem os receptores de outras citocinas e outras ainda apresentam interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas (RANG *et al.*, 2007).

As citocinas pró-inflamatórias participam das reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como, dos processos de reparo. As citocinas pró-inflamatórias primárias incluem TNF- α e a IL-1. Um importante evento inicial na resposta imunológica inata

consiste no reconhecimento, por macrófagos teciduais, de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), como o lipopolissacarídeo bacteriano. Os receptores que reconhecem os PAMP, alguns denominados receptores Toll (TLR), são codificados no DNA do hospedeiro e expressos na superfície das células dendríticas e macrófagos, isto é, células apresentadoras de antígeno. A interação TLR-PAMP deflagra vias de sinalização intracelulares que resultam na produção das principais citocinas pró-inflamatórias o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina (IL-1). Estas citocinas atuam sobre as células endoteliais vasculares das vênulas pós-capilares causando: aumento da permeabilidade e expressão de moléculas de adesão na superfície íntima das células (RANG *et al.*, 2007).

Tanto o TNF- α quanto a IL-1 induzem vias de sinais que levam a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Por conseguinte, esse fator de transcrição desempenha um papel chave na indução de respostas inflamatórias e imunes. Na célula não estimulada, o NF- κ B é inativo, uma vez que está complexado com um inibidor I κ B. Quando uma célula é estimulada, ocorre liberação de NF- κ B, que penetra no núcleo e inicia a transcrição de genes para uma variedade de mediadores inflamatórios e imunológicos. A implicação desse fator de transcrição como alvo terapêutico decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação pelo fator NF- κ B, implicados em vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Entre tais genes podem ser mencionados os envolvidos na produção de enzimas, como as óxido nítrico sintase e ciclooxigenase-2 induzíveis e a enzima de defesa antioxidante superóxido dismutase; interleucinas, fator de necrose tumoral, moléculas de superfície celular, como a molécula 1 de adesão de célula vascular, molécula 1 de adesão de célula intracelular, E-selectina, complexos de histocompatibilidade de classe I e II; proteínas de fase-aguda, como amilóide série A (GLEZER, 2000, RANG *et al.*, 2007).

Os eicosanóides são produzidos a partir do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado que se encontra esterificado nos fosfolípidios. O AA é liberado a partir dos lipídeos de membrana através da ativação da fosfolipase A₂. Uma vez liberado, o AA é substrato de duas importantes classes de enzimas: as cicloxigenases (COXs), responsáveis pela síntese de prostaglandinas e tromboxanos; e as lipoxigenases formando os leucotrienos e as lipoxinas (**Figura 3**) (FLOWER & PERRETTI, 2005).

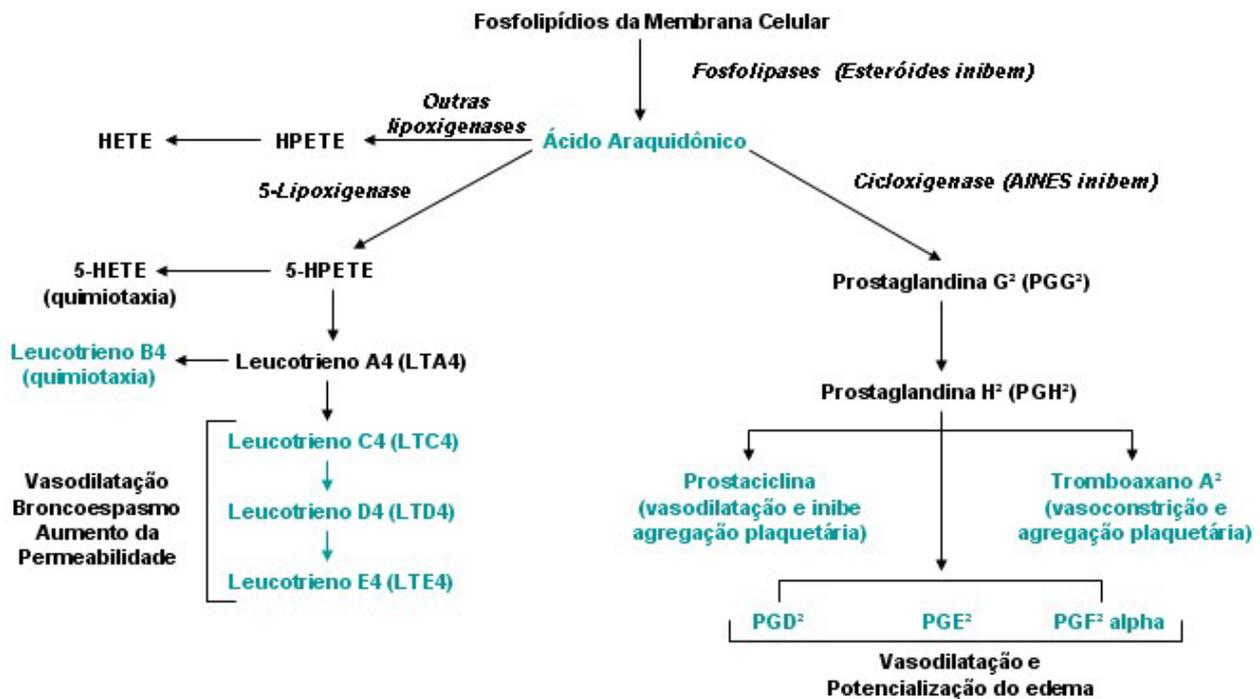


Figura 3- Metabolismo do ácido araquidônico e seus papéis na inflamação (COLLINS, 2000).

Pelos mecanismos COX-dependentes, o AA é inicialmente convertido em um composto intermediário denominado PGG₂ pelo sítio ciclooxigenase e em PGH₂ pelo sítio peroxidase. Este não é inibido pelos antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs). Os produtos

gerados pela via COX dependem da célula envolvida. Por exemplo, nas plaquetas essa via leva a síntese de tromboxano A₂; no endotélio vascular ocorre síntese de prostaciclina (PGI₂); nos macrófagos resulta em síntese de PGE₂ enquanto que os mastócitos sintetizam PGD₂ (VANE & CORIN, 2003).

Prostanóides são mediadores lipídicos ubíquos que coordenam uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos via receptores de membrana em células alvo. Sob condições fisiológicas, prostanóides têm um papel importante na citoproteção da mucosa gástrica, homeostase e hemodinâmica renal. A biossíntese de prostanóides é induzida em diferentes condições patológicas, incluindo inflamação crônica e câncer (PATRIGNANI *et al.*, 2004).

A COX-1 é uma enzima constitutiva de ampla ocorrência (expressa na maioria dos tecidos do corpo humano: musculatura lisa vascular, nas células do estômago, rins e plaquetas), em um nível constante. Prostaglandinas gástricas são derivadas quase que exclusivamente da ação da COX-1 (EMERY *et al.*, 1999). A COX-2, porém, é uma enzima predominantemente induzida por citocinas inflamatórias e fatores de crescimento em resposta a reações inflamatórias e dano tecidual (como trauma cirúrgico). Com exceção do cérebro, órgãos reprodutivos, rins e ossos e na placenta durante o final da gestação (McMURRAY & HARDY, 2002), a COX-2 é expressa em baixas quantidades na maioria dos tecidos normais. A atividade da COX-2 está normalmente ausente nas células, mas diante de estímulos como mediadores inflamatórios tipo citocinas (IL-1 e TNF- α), fatores de crescimento ou mitógenos sua expressão é aumentada em até 10 a 80 vezes (NOVAES & MELO, 2000).

O sítio de ligação dos AINEs na COX-2 é 25% maior que na COX-1, existindo um local secundário, um sítio catalítico que permite o bloqueio seletivo desta enzima sem

afetar a COX-1. Com base nessas informações foi então sugerido que COX-2 é o alvo relevante para os efeitos dos AINEs, enquanto que a inibição de COX-1 por esses fármacos causaria redução das prostaglandinas necessárias para a citoproteção da mucosa gástrica, fluxo plasmático renal e agregação plaquetária, sendo responsável por ulceração e hemorragia da mucosa gástrica, redução do fluxo sanguíneo renal e alterações na coagulação sanguínea, efeitos colaterais comuns com o uso crônico dos AINEs. Atualmente já se sabe da existência de uma terceira isoforma das COXs, derivada da COX-1 e que compartilha com esta, propriedades semelhantes em termos de homeostasia. Tal isoenzima, denominada COX-3, parece estar presente preferencialmente a nível cerebral (CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002).

1.2.2. Resposta Inflamatória Crônica: A Artrite Reumatóide

Diferente da inflamação aguda que se manifesta por alterações vasculares, edema e infiltração de neutrófilos, a inflamação crônica se caracteriza por: infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos, e plasmócitos, reflexo de uma reação persistente a lesão; destruição tecidual, induzida pelas células inflamatórias; tentativas de cicatrização por substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada por proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular fibrose (COLLINS, 2000).

A inflamação crônica é considerada aquela de duração prolongada na qual a inflamação ativa, destruição tecidual e tentativas de reparo estão ocorrendo simultaneamente. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica com frequência começa de maneira insidiosa, como uma resposta de baixo grau, latente e muitas

vezes assintomática. Este tipo de inflamação crônica inclui algumas doenças comuns e incapacitantes, como a artrite reumatóide, aterosclerose, tuberculose e doenças pulmonares crônicas (COLLINS, 2000).

A artrite reumatóide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia auto-imune. Caracteriza-se basicamente por sinovite crônica, simétrica e erosiva, preferencialmente de articulações periféricas, e a maioria dos pacientes apresenta fator reumatóide positivo. Tem prevalência de, aproximadamente, 1% na população brasileira, similar à literatura mundial, e predominante no sexo feminino, com tendência a surgir após à quarta década de vida, com pico de incidência na quinta década. A AR é uma doença muito heterogênea em termos de gravidade e ritmo de progressão da inflamação articular, presença de manifestações extra-articulares e de resposta ao tratamento farmacológico (BRENOL *et al*, 2007).

A patologia da sinovite reumatóide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora se desconheça o evento desencadeador, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T. Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação da proliferação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um “*pannus*” (tecido sinovial proliferado) invasivo de rápido crescimento, que atinge o osso subcondral e, em seguida, a cartilagem articular, com destruição progressiva. As perdas focais de osso marginal e subcondral contribuem decisivamente para a morbidade da doença. Estudos em tecidos humanos e provenientes de modelos animais apontam o osteoclasto como a principal célula envolvida neste processo.

A ativação e o recrutamento de tais células são influenciados por citocinas e mediadores inflamatórios (BRENOL *et al*, 2007; FILIPPIN *et al*, 2008).

Apesar da identificação de mais de 100 diferentes tipos de citocinas, quimiocinas e outros fatores envolvidos na patogênese da AR, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) continua ocupando lugar de destaque na doença erosiva da articulação por meio da ativação dos osteoclastos. A produção de citocinas, predominantemente as pró-inflamatórias, tem papel fundamental na iniciação e perpetuação da inflamação crônica na membrana sinovial. A resposta T auxiliar do tipo I gera a produção de interferon-gama (IFN- γ), que estimula a liberação de TNF- α , interleucina-1 beta (IL-1 β) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais (BRENOL *et al*, 2007).

Radicais reativos de oxigênio e nitrogênio também têm papel na patogênese da AR. Radicais reativos de oxigênio, como o superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ácido hipocloroso, bem como radicais reativos de nitrogênio, como óxido nítrico e peroxinitrito, contribuem significativamente para o dano tecidual. Experimentalmente, verifica-se que a excessiva produção dessas espécies reativas pode levar a uma aceleração no dano à cartilagem articular e ativação de osteoclastos (BRENOL *et al*, 2007; FILIPPIN *et al*, 2008).

Em 1898, Felix Hofmann em busca da cura para a artrite que afligia seu pai, o qual era sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio, sintetizou o ácido acetil-salicílico a partir de salicilatos obtidos da casca da *Salix alba* planta da família Salicaceae, menos ácido que o ácido salicílico, o ácido acetil-salicílico manteve a propriedade analgésica desejada. Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária

(VIEGAS-JÚNIOR, BOLZANI & BARREIRO, 2006). Os produtos naturais são uma fonte rica em substâncias utilizadas para o desenvolvimento de fármacos com as mais diversas propriedades farmacológicas, entre elas, propriedades antiinflamatórias e analgésicas como demonstrado na síntese do ácido acetil-salicílico (AAS). Desta forma, faz-se necessário o estudo de plantas medicinais para descobrir moléculas bioativas ou protótipos para a síntese de novos fármacos mais potentes e com menor toxicidade que os disponíveis no mercado, bem como, substâncias que atuem em alvos terapêuticos diferentes.

1.3. Produtos Naturais Como Fonte de Recursos Terapêuticos

Uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais talvez tenha sido a ingestão de ervas e folhas para buscar alívio e cura de doenças. Ricos exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa são encontrados no desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental, merecendo destaque à civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS-JÚNIOR, BOLZANI & BARREIRO, 2006).

A história da terapêutica começa provavelmente por Mitriates, Século II a.C., sendo ele o primeiro farmacologista experimental. Nessa época, já eram conhecidos os opiáceos, a cila e inúmeras plantas tóxicas. No papiro de Ebers, de 1550 a.C. descoberto em meados do século XIX em Luxor, no Egito, foram mencionadas cerca de 700 drogas diferentes, incluindo extratos de plantas, metais (chumbo e cobre) e veneno de animais. As plantas medicinais são um importante elemento da medicina indígena. Na Amazônia, por exemplo, os indígenas usam pelo menos 1.300 espécies de plantas. No Sudeste da Ásia, os curadores tradicionais utilizam 6.500 plantas diferentes para tratar malária, úlceras de estômago, sífilis e outras doenças (KONG *et al.*, 2003).

A descoberta de substâncias, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade farmacológica, muitas vezes já confirmada pelo

uso popular e comprovada cientificamente, gera interesses institucionais e governamentais (MIGUEL & MIGUEL, 2000).

Segundo Siani e Michiles (2005), acima de 25% dos fármacos hoje prescritos são derivados ou foram inspirados em substâncias obtidas de plantas superiores, e cerca de 11% dos 252 fármacos considerados essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS) originaram exclusivamente destas plantas. Os maiores impactos no setor de fitofármacos são confirmados nos fármacos antitumorais, onde recente prospecção revelou que 61% das 877 moléculas introduzidas como fármacos foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais. Em certas áreas terapêuticas, estes valores sobem para 78% (antibacterianos). Com o aumento de microorganismos resistentes aos fármacos antimicrobianos já conhecidos, vários extratos de plantas medicinais foram testados, com finalidade de se procurar novas substâncias com atividade antimicrobiana reconhecida (BASTOS, 2007).

Estudos apontam que no desenvolvimento de novos medicamentos de 22.900 substâncias sintetizadas apenas uma alcançará a aprovação dos órgãos reguladores internacionais de medicamento; apesar dos investimentos necessários em tempo (cerca de 12 anos), recursos humanos e tecnologias avançadas, que vão de US\$ 250 milhões a 880 milhões e já chegaram a ultrapassar US\$ 2,3 bilhões. Essas condições têm desestimulado os investimentos em pesquisa para o lançamento de novos fármacos sintéticos. Já um medicamento de origem vegetal com base em informações tradicionais, em relação a um medicamento sintético, apresenta maior aprovação (4:1) com o tempo de investimento entre 5 e 7 anos, e um custo estimado em US\$ 3 a 8 milhões. Estes dados justificam a atenção dos diversos setores que se ocupam do estudo de plantas medicinais (SIANI & MICHILIS, 2005).

As plantas medicinais devem ser consideradas não apenas como matéria-prima, ponto de partida para a descoberta de novas moléculas, mas também como um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado (REIS, MARIOT & STEENBOCK, 2004). A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicamentosa que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, a ponto do mercado mundial girar em torno de 22 bilhões de dólares ao ano, atingindo US\$ 8,5 bilhões na Europa, US\$ 6,6 bilhões nos Estados Unidos e R\$ 400 milhões no Brasil. Estima-se que a taxa de crescimento é da ordem de 15% contra 4% dos medicamentos sintéticos, tendendo a aumentar, nos próximos cinco anos (BORELLI, CAPASSO & CAPASSO, 2006).

No Brasil, a dificuldade na aquisição de medicamentos sentida por milhões de pessoas que não podem comprar e dependem exclusivamente do Sistema Único de Saúde, fere um dos pilares da constituição, na qual: “saúde é um direito universal de todos os cidadãos brasileiros”. A falta de acesso ao medicamento leva a um agravamento de enfermidades, sofrimento individual e familiar, além da perda da qualidade de vida e prejuízos relacionados ao trabalho e geração de renda. A população encontra no uso dos produtos naturais uma alternativa para solucionar seus problemas de saúde (LA CRUZ, 2005).

Nas grandes cidades brasileiras, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e ainda encontradas em quintais residenciais, e continuam sendo utilizadas com finalidade terapêutica. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo mundo, mantém a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL, PINTO & VEIGA 2002).

Os produtos naturais e derivados foram e continuam sendo notoriamente de importância crucial em determinados setores da sociedade moderna, mesmo considerando-se o grande número de produtos produzidos por síntese. Segundo a OMS 65-80% da população dos países em desenvolvimento, e entre estes o Brasil, dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CALIXTO, 2005). Vê-se um interesse crescente na utilização e pesquisa de plantas medicinais, objetivando-se fins terapêuticos, aliadas à boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico e as altas cifras que circundam a utilização de fitomedicamentos, observada na última década (NOLDIN, ISAIAS & CECHINEL FILHO, 2006).

Além disso, o Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GUERRA & NODARI, 2004). Muitas destas espécies ainda nem foram descritas, catalogadas e estudadas. A lista oficial da flora brasileira ameaçada de extinção, editada em 1992 (Portaria IBAMA 037-N), relacionava um total de 107 espécies. Entretanto, o grau de precisão desta lista é bastante questionável, principalmente pela falta de atualização, o que ilustra mais uma vez a carência de conhecimento sobre nossa diversidade (MEDEIROS, 2003).

Diante do exposto, faz-se importante o estudo das plantas brasileiras e de suas atividades farmacológica, sendo este um dos objetivos do grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacologia e Imunidade. O alvo deste trabalho foi estudar extratos e diterpenos de *Xylopiá langsdorffiana* uma planta da família Annonaceae. Estudos têm mostrado que espécies dessa família são ricas em metabólitos secundários bioativos.

1.4. Considerações Sobre a Família Annonaceae

A família Annonaceae foi catalogada em 1789 por Jussieu (HUTCHINSON, 1973). Annonaceae constitui uma família primitiva e pertencente à ordem Magnoliales (CRONQUIST, 1981). Apresenta 2.300 espécies, distribuídas em aproximadamente 130 gêneros (MAAS *et al.*, 2001). Sua distribuição geográfica ocorre quase que exclusivamente em regiões tropicais (HEYWOOD, 1985), sendo que no neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies. As plantas dessa família são arbóreas sendo as trepadeiras também muito freqüentes. Além de seus frutos, na maioria dos casos, serem comestíveis também são muito usados na terapêutica popular (CHATROU, RAINER & MAAS, 2004).

Na **Figura 4** encontra-se representada a distribuição da família Annonaceae no mundo; 50 gêneros são encontrados na Ásia e Austrália, na África 34 gêneros, enquanto no continente Americano são conhecidos 39 gêneros (BRUMMITT, 1992). Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, com predominância dos gêneros *Annona* L., *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavan, *Rollinia* St. Hil. e *Xylopia* L. No Brasil, há relatos de aproximadamente 27 gêneros da família Annonaceae, compreendendo cerca de 260 espécies (MOREIRA *et al.*, 2007). A família apresenta considerável riqueza de espécies principalmente na região amazônica e na floresta atlântica (LOBÃO, ARAÚJO & KURTZ, 2005). Segundo Walker, a família Annonaceae é originária da Ásia e Austrália, e mais recentemente, Lê Thomas, descreveu que esta família teve origem na África ou na América do Sul (LEBOEUF *et al.*, 1982).



Figura 4- Mapa de distribuição da família Annonaceae no mundo representada em vermelho (www.arbolesornamentales.com/Annonaceae.jpg)

A família Annonaceae é conhecida principalmente por seus frutos comestíveis, tais como a pinha, fruta do conde ou ata (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.). Muitas árvores desta família são cultivadas, por suas sementes serem fontes de óleos fixos utilizados como óleos comestíveis ou para o preparo de sabão. Outras espécies têm sido empregadas na produção de álcool, na perfumaria e na medicina popular para vários propósitos (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Em termos taxonômicos, a família Annonaceae constitui um grupo muito uniforme, seja do ponto de vista anatômico, estrutural, de hábito e hábitat, distinguindo-se por apresentarem uma combinação de características bem marcantes. São vegetais lenhosos, arbustivos ou arborescentes. Possuem folhas simples, inteiras, alternadas e sem estípulas. As flores, hermafroditas, são quase sempre vistosas e geralmente solitárias. Há muitos estames, mais ou menos sésseis, inseridos em espiral. O ovário é constituído por vários

carpelos (raras vezes um só). O fruto é geralmente uma baga carnosa, muitas vezes comestível, freqüentemente é uma região de várias bagas no mesmo receptáculo (SCHULTZ, 1984).

Do ponto de vista da constituição química, a família Annonaceae é caracterizada pela presença de alcalóides derivados de benzilisoquinolinas, principalmente aporfínicos. São registradas ainda, ocorrências em quantidade significativa, de flavonóides e terpenóides, especialmente diterpenos. Na última década, as acetogeninas vêm sendo muito pesquisadas em espécies desta família, consideradas muito importantes devido aos seus efeitos citotóxico, antimicrobiano e inseticida (RUPRECHT, HUI & LAUGHLIN, 1990).

1.5. Considerações sobre o Gênero *Xylopi* L.

O gênero *Xylopi* é constituído de cerca de 150 espécies (BRUMMITT, 1992). Algumas são usadas como condimentos enquanto outras fornecem fibras para a cordoaria. O lenho é leve, duradouro e algumas espécies apresentam propriedades medicinais (ROCHA, SILVA & PANNIZA, 1979). O fruto de algumas espécies do gênero *Xylopi* é usado popularmente como condimento por apresentar odor semelhante ao da pimenta-do-reino (*Piper nigrum*) e é empregado, por este motivo, como seu substituto (CHADWICH, 1990). Muitos são usados também como carminativos. Várias espécies são utilizadas para diversos fins e, em especial, na medicina popular como vermífugos (THOMAS, 1989) e agentes antimicrobianos (CORREA, 1984).

Estudos etnofarmacológicos já foram realizados com espécies desse gênero, por exemplo, *X. aethiopica* é utilizada para o tratamento de bronquite e desintéria, *X. aromatica* como agente diurético e para edema de pele, *X. sericeae* como antiinflamatório e *X. cayennensis* para problemas cardiovasculares (MOREIRA, 1999; MACÊDO & FERREIRA, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Um grande número de componentes químicos tem sido isolado do gênero *Xylopi*, incluindo acetogeninas biologicamente ativas, dentre elas, a xylopiena e a xylomatenina com atividade citotóxica superior à adramicina para três linhagens de células tumorais (COLMAN-SAIZARITORIA, ZAMBRANO & FERRIGNI, 1994), diterpenos do tipo caurano e labdano (FELICIO & ROQUE 1989), sesquiterpenos (MOREIRA *et al.*, 2007), alcalóides (HARRIGAN *et al.*, 1994), lignóides (WAHI, ROBLOT & CAVE, 1995) e flavonóides (SANTOS & SALATINO, 2000). Dentre os alcalóides os mais comuns são os

derivados do núcleo isoquinolínico e terpenóides do tipo caurano, trachilobano, atisano, labdanos, inclusive dímeros (HARRIGAN *et al.*, 1994, FELICIO & ROQUE 1989).

Além dos constituintes acima mencionados têm sido publicado dezenas de artigos sobre óleos essenciais de espécies do gênero *Xylopi*a demonstrando que o gênero é rico em monoterpenos e sesquiterpenos (LAGO *et al.*, 2003, MAIA *et al.*, 2005). Vários óleos apresentaram atividade antimicrobiana e citotóxica (ASEKUN & ADENIYI, 2004), e também são utilizados em cosmetologia e perfumaria e têm mostrado o espatulenol como um possível marcador quimiotaxônomico, estando presente em quase todas as espécies de *Xylopi*a que foram estudadas (MAIA *et al.*, 2005).

1.6. Considerações sobre *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul

Xylopia langsdorffiana é uma árvore de 5 – 7 m de altura. Possui folhas alternas, lanceoladas, inteiras, seríceas, flores roxas e pendunculadas (**Figura 5**). Fornece: madeira para obras internas, carpintaria e caixotaria. A casca dá líber para cordoaria. É conhecida popularmente como pimenteira-da-terra (CORREA, 1984). Esta planta vem sendo estudada pelo LTF (Laboratório de Tecnologia Farmacêutica –UFPB) desde 2002 por ser considerada uma fonte promissora de substâncias bioativas.

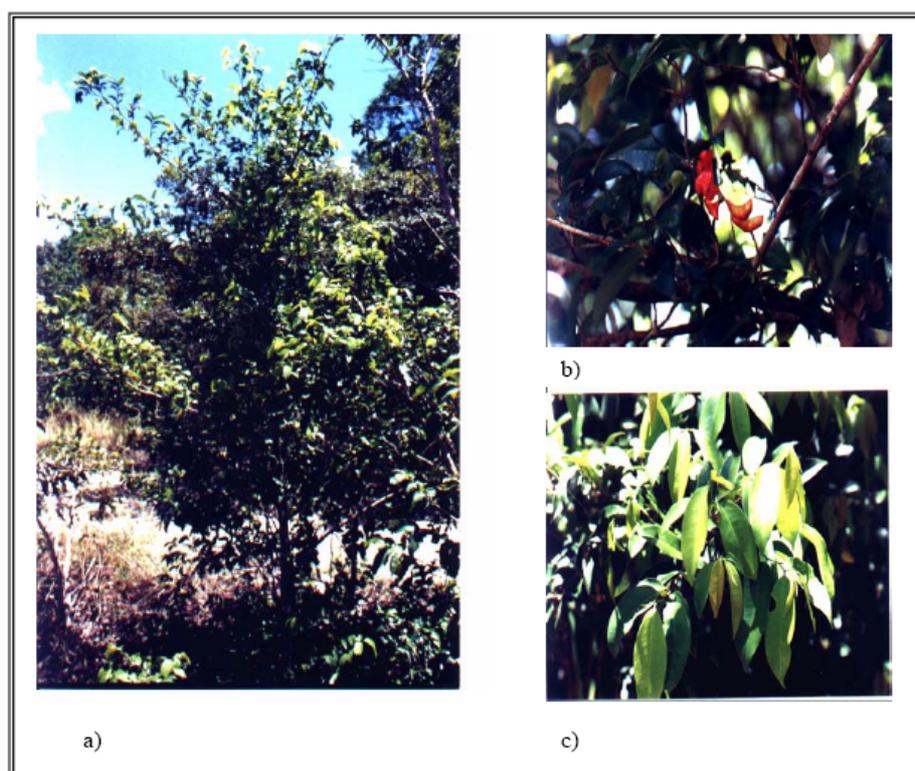


Figura 5- Fotos de *Xylopia langsdorffiana* em seu habitat. a) árvore completa, b) detalhe dos frutos e c) detalhe das folhas. Foto: Professor Dr. Josean Fechine Tavares.

Dois diterpenos do tipo trachilobano foram isolados da casca do caule de *Xylopi langsdorffiana*, a partir do seu extrato clorofórmico, ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico (XLC) e ácido ent-7 α -de hidroxitrachiloban-18-óico (**Figura 6**) (TAVARES *et al.* 2006). A partir do fracionamento do extrato etanólico, obtido das cascas do caule de *Xylopi langsdorffiana*, foi isolado um diterpeno tipo labdano, identificado como sendo o ácido labda-8(17),12*E*,14-trien-18-óico (XL) (**Figura 6**) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

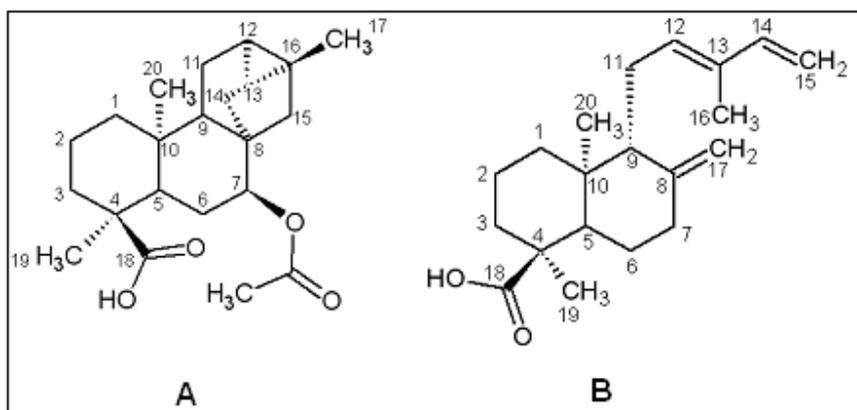


Figura 6- Estruturas moleculares dos diterpenos isolados de *X. langsdorffiana*. **A:** ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico (XLC); **B:** ácido labda-8(17),12*E*,14-trien-18-óico (XL).

1.7. Metabólitos Secundários do Tipo Terpenóides

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. O metabolismo é a representação do conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. No caso das células vegetais, o metabolismo costuma ser dividido em primário (atividades metabólicas essenciais que envolvem aminoácidos, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos) e secundário (envolvendo compostos que não possuem distribuição universal e, portanto, não são necessários a todas as plantas como, por exemplo, alcalóides e flavonóides) (KAUFMAN *et al.*, 1999).

Uma importante classe de metabólitos secundários é representada pelos terpenos, um grupo de compostos naturais com ampla distribuição, compreendendo mais de 1500 compostos, além de uma variedade estrutural envolvendo mais de 40 tipos de esqueletos básicos (NES & ZHOU, 2001).

Os compostos terpênicos possuem em comum o fato de serem constituídos por múltiplos ou inteiros da molécula fundamental do isopreno (2-metilbutadieno), (**Figura 7**); que se origina a partir do ácido mevalônico. A denominação de terpenos se reserva para os hidrocarbonetos saturados (terminação eno), estes podendo ser considerados como polímeros por adição ou condensação de moléculas do isopreno. Isto implica, além de uma fórmula bruta inteira do isopreno (C₅H₈), como também uma estrutura ramificada que permita reconhecer as unidades integrantes da molécula (ROBBERS, TYLER & SPEEDIE, 1997).

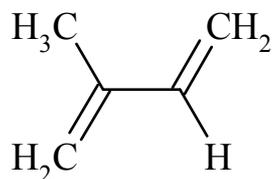


Figura 7- Molécula fundamental do isopreno

Além destes verdadeiros terpenos, temos os chamados terpenóides. A química dos terpenóides inclui compostos como alguns hidrocarbonetos que possuem menor ou maior teor de hidrogênios do que os terpenos verdadeiros, conservando no entanto a estrutura das unidades isoprênicas. Os esqueletos carbonados dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades de isopreno predominando a condensação cabeça-cauda (SIMÕES & SPITZER, 2004).

A classificação dos terpenóides é realizada de acordo com a quantidade de unidades isopreno: hemiterpenóides, C5; monoterpenóides, C10 e sesquiterpenóides, C15 (componentes dos óleos essenciais, que contribuem para o aroma das plantas); diterpenóides, C20; triterpenóides C30; tetraterpenos (ou carotenóides), C40 (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Esses compostos (terpenóides) apresentam variadas funções: os monoterpenos são constituintes dos óleos voláteis, atuando na atração de polinizadores. Os sesquiterpenos, em geral, apresentam funções protetoras contra fungos e bactérias, enquanto muitos diterpenóides dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Os triterpenóides e seus derivados, os esteróides, apresentam uma gama de funções. Muitos têm funções de

proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (HARBONE & BAXTER, 1995).

Os terpenóides podem ser encontrados nas formas cíclica e linear. As formas cíclicas poderão compor um número imenso de formas de estereoisômeros, por outro lado, os terpenóides lineares apresentam isomerismo geométrico nas duplas ligações isoprênicas. Os compostos mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos essenciais) e os sesquiterpenos. O número de compostos terpênicos conhecido ultrapassa a 8.000, como componentes descritos em óleos essenciais é estimado um número superior a 150 monoterpenos e 1.000 sesquiterpenos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os compostos terpênicos apresentam importantes atividades farmacológicas tais como, anti-tumoral (CARNESECCHI *et al.*, 2004), sedativas (DO VALE *et al.*, 2002) analgésicas, antiinflamatórias (IWAMOTO *et al.*, 2001; AHMAD *et al.*, 2005; KUPELI *et al.*, 2003; RAJIC *et al.*, 2000), cardioprotetores (LEIGOTT *et al.*, 2000); bloqueadores de canais de cálcio (WANG *et al.*, 2000), antioxidantes (ZHANG *et al.*, 1996), hipolipidêmica (SILVA *et al.*, 2001), antihipertensivas, relaxantes da musculatura vascular (TORRES *et al.*, 2000), antimicrobiana (MADUREIRA *et al.*, 2003), antiulcerogênica (HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002), gastroprotetora (GUEDES, 2002), antinociceptiva (GUEDES *et al.*, 2002; LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2006), hepatoprotetora (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Os diterpenos, compostos orgânicos de baixo peso molecular, apresentam um esqueleto contendo 20 átomos de carbono e derivam biogeneticamente do pirofosfato de geraniol geranila que resulta do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades de isopreno (DZEROSKI *et al.*, 1998). Muitos estudos realizados com extratos de plantas contendo diterpenos mostraram uma variedade de atividades farmacológicas, como a atividade anti-ulcerogênica do Trans-Crotonina, diterpeno isolado do *Croton cajucara* Beth

(HIRUMA-LIMA *et al.*, 2002); atividade analgésica do mirsinol, diterpeno isolado de *Euphobia decipiens* (AHMAD *et al.*, 2005); atividade analgésica e antiinflamatória do taxóide e lignanas, diterpenos isolados de *Taxus baccata* L. (KUPELI *et al.*, 2003); atividade citotóxica do diterpeno ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico e atividades no bloqueio de canais de cálcio e relaxamento de traquéia do diterpeno ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico isolados de *Xylopija langsdorffiana* St-Hil & Tul (TAVARES *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Em continuidade a linha de pesquisa do Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) que visa a identificação de novos protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e imunomoduladores, este trabalho tem como objetivo o estudo farmacológico de extratos e compostos isolados da espécie *Xylopija langsdorffiana*, planta da família Annonaceae em modelos funcionais de nocicepção e inflamação.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a dose letal aproximada para os dos extratos etanólico e clorofórmico obtidos do caule de *X. langsdorffiana*, bem como dos diterpenos ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico (XL) e ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico (XLC) isolados destes extratos;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção induzida por formalina) dos extratos etanólico e clorofórmico e dos diterpenos XL e XLC;
- ✓ Investigar uma possível ação central no modelo de Placa quente;
- ✓ Pesquisar a atividade antiinflamatória em modelos animais de inflamação (edema de orelha induzido por capsaicina, migração celular induzida por zymosan e artrite experimental em ratos) dos extratos etanólico e clorofórmico e dos diterpenos XL e XLC;

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material botânico

O caule de *X. langsdorffiana* foi coletado no município de Cruz do Espírito Santo, estado da Paraíba, em julho de 2002. O material botânico foi identificado pela Professora Dr.^a. Maria de Fátima Agra, do Setor de Botânica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) - UFPB, e uma exsicata da planta está depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), da UFPB, sob identificação AGRA 5541.

3.2. Extratos e substâncias utilizadas

Foram utilizados os extratos etanólico (EEt) e clorofórmico (ECI) e os diterpenos do tipo labdano, ácido labda-8(17),12E,14-trien-18-óico (XL) e do tipo trachilobano, ácido ent-7 α -acetoxitrachiloban-18-óico (XLC) obtidos da casca do caule de *X. langsdorffiana*. Os extratos e substâncias foram cedidos pelos professores, Dr. Marcelo Sobral da Silva e Dr. Josean Fechine Tavares do LTF – UFPB, sendo a extração e isolamento descritos por Tavares *et al.* (2006) e Oliveira *et al.* (2006). Como fármacos padrões foram utilizados: dipirona (Sigma Aldrich), indometacina (Merck), morfina (Dimorf-Cristalia-BR) e talidomida (Sigma Aldrich). Para realização dos diferentes ensaios foram utilizados: ácido acético (Vetec), formaldeído (Vetec), capsaicina (Sigma Aldrich), capsazepina (Sigma Aldrich), zymosan A (Sigma Aldrich) e adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich). Em todos os experimentos, as substâncias, extratos e fármacos foram administrados em uma suspensão de Tween 20 (Sigma Aldrich) e água destilada (0,05%) por via intraperitoneal (i.p.).

3.3. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem suíço, pesando entre 25-30 g, machos ou fêmeas, adultos com 6 a 8 semanas de idade. apenas no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de freud foram utilizados ratos wistar, pesando entre 150 – 200 g, machos ou fêmeas, adultos com 5 a 8 semanas, provenientes do biotério central da universidade federal de alagoas. em todos os experimentos foram utilizados grupos de seis animais cada. após utilização nos experimentos os animais foram eutanasiados com co₂. o trabalho teve aprovação prévia do comitê de ética da ufal (número do processo: 006113/2005-82). todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela comissão de ética internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação (ZIMMEMAN, 1983).

3.4. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O perfil antinociceptivo foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Quarenta minutos após a administração dos extratos, substâncias e fármaco padrão (dipirona), foi realizada a administração de ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Cinco minutos após a injeção, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Foram feitos controles do veículo (Tween 20/água destilada) (COOLIER, DINNEN & SCHNEIDER, 1968).

3.5. Ensaio de nociceção induzida por formalina

O ensaio consistiu na injeção de 20 µL de uma solução de formalina 2.5% (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira do camundongo quarenta minutos após a administração dos extratos, substâncias e fármaco padrão (indometacina). O tempo (segundos) em que o animal permaneceu lambendo a pata foi registrado. Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: primeira fase - primeiros cinco minutos e segunda fase - 15-30 minutos após a injeção, que são respectivamente relacionadas à dor neurogênica e dor inflamatória (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

3.6. Ensaio da placa quente

A atividade analgésica central foi avaliada através do teste da placa quente ($55 \pm 0,1$ °C). Os camundongos foram colocados sobre a placa aquecida e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida das patas traseiras ou dianteiras) foram cronometrados. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-off” (máximo de permanência do animal na placa) de 10 segundos. Feito isso, os extratos, substâncias e fármaco padrão (morfina) foram administrados. Tem-se um intervalo de 30 minutos e aí as medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas (EDDY & LEIMBACK 1953).

3.7. Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina

Este ensaio consistiu na administração local (orelha direita) de 20µL de uma solução de capsaicina diluída em acetona (12,5 mg/mL), 40 minutos após a administração dos extratos, substâncias e fármaco padrão (indometacina). O ensaio é caracterizado por uma reposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Os animais foram sacrificados após 30 minutos da administração de capsaicina e suas orelhas pesadas para obtenção do índice de inflamação, e em seguida os pesos das orelhas inflamadas foram comparados com os pesos da orelha contra-lateral que não foi tratada com o agente flogístico. Foi utilizada uma solução de capsazepina em acetona (10,0 mg/mL). Neste ensaio, após a administração i.p. das substâncias, 20µL da solução de capsazepina (0,2 mg/20µL) em acetona foi administrada localmente na orelha direita do camundongo e após 10 minutos, 20µL de uma solução de capsaicina diluída em acetona (12,5 mg/mL) foi administrada. Após 30 minutos os animais foram sacrificados e o índice de inflamação calculado (SANCHEZ & MORENO, 1999).

3.8. Ensaio de peritonite induzida por Zymosan A

Os camundongos foram tratados ou não com as substâncias em análise, 30 minutos após o tratamento foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração i.p. de 0,5 mL de uma solução estéril de Zymosan A (Sigma) (2 mg/mL). Após 6 h da injeção com Zymosan A (Sigma), os animais foram eutanasiados e a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de Ca²⁺ e Mg²⁺). Em seguida o lavado peritoneal foi analisado e foi realizada a contagem total do número de células em câmara de Neubauer utilizando microscópio ótico na objetiva de 40x (DOHERTY *et al.*, 1985).

3.9. Ensaio de artrite induzida por Adjuvante completo de Freund

Este ensaio consistiu da administração de 100 µL de Adjuvante completo de Freund (1 mg/mL) por via intradérmica na face dorsal da pata do rato. O tempo total de experimento foi de 21 dias. No dia 0 os animais foram pesados, as patas medidas e realizada a indução de artrite. A partir do 14º dia os animais foram tratados ou não com as substâncias e o tratamento mantido até o 21º dia. No 22º os animais foram eutanasiados (NEWBOULD, 1963).

3.10. Toxicidade aguda

Os camundongos foram tratados com os extratos (EEt e ECl) e substâncias (XL e XLC) com uma dose 5 vezes maior que a maior dose utilizada nos demais ensaios, ou seja, 500 mg/Kg para os extratos e 500 µmol/Kg para as substâncias. Os animais foram observados por um período de 72 h, sendo a morbidade e mortalidade, caso aconteçam, detectadas até o fim do período (AKKOL, YESILADA & GUVENÇ, 2008).

3.11. Análise Estatística

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram realizados utilizando o teste *t* de Student ou ANOVA seguido de teste de Dunnet. A DI₅₀ foi calculada através da curva de regressão não-linear (sigmoidal dose-resposta). Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras. As análises foram realizadas no GraphPad Prism® versão 3.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da atividade antinociceptiva

4.1.1. Efeito dos EEt e ECl, XL e XLC no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Inicialmente foi realizado o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A via i.p. foi escolhida, uma vez que esta elimina o efeito de primeira passagem e/ou anula a possibilidade destas moléculas estarem sofrendo degradação em pH ácido estomacal. Quando o EEt, na concentração de 100 mg/Kg, quando administrado por via i.p. apresentou uma inibição da contorção abdominal da ordem de 64,7% (**Figura 8**). Já o fármaco padrão utilizado, a dipirona, via i.p. na dose de 10 mg/Kg, apresentou uma inibição de 63,4%. Portanto, assim como a dipirona, o extrato possui uma atividade antinociceptiva, quando administrado por via i.p.. Em seguida, foi avaliada a atividade antinociceptiva do ECl. Os resultados mostraram que este foi capaz de inibir 62,5% da resposta hipernociceptiva deste modelo, resultado semelhante à dipirona que induziu 63,4% de inibição. Ainda foi realizado o ensaio de contorção abdominal com compostos isolados dos extratos de *X. langsdorffiana*, XL e XLC. Ambos foram administrados por via i.p. numa dose de 300 µmol/Kg. A XL induziu uma inibição de 61,25% e a XLC atingiu uma inibição de 53,71% (**Figura 8**).

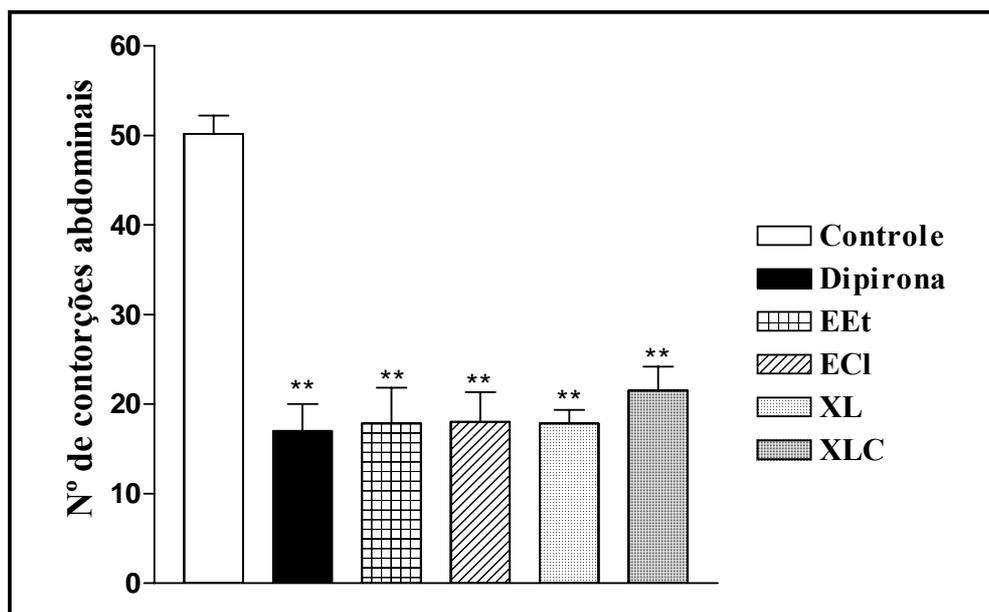


Figura 8- Efeito da dipirona (10 mg/Kg, i.p.), EEt e ECI (100 mg/Kg, i.p.) e dos seus purificados, XL e XLC (300 μ mol/Kg, i.p.), em ensaio de nociceção induzida por ácido acético. (**P<0,01 foi considerado significativo ao nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).

O ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos é amplamente utilizado como ferramenta para o screening de novos agentes analgésicos e antiinflamatórios, sendo descrito como um modelo típico para o estudo de dor inflamatória (TJØLSEN & HOLE, 1997). O ácido acético atua diretamente induzindo a liberação de vários mediadores, que são alvos dos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e/ou alvos para fármacos opióides (COOLIER, DINNEN & SCHNEIDER, 1968).

As mais importantes vias de transmissão da dor inflamatória compreendem os nociceptores polimodais periféricos sensíveis a prótons, tal como os canais iônicos sensíveis a ácido e substâncias algogênicas, como bradicinina, prostaglandinas e citocinas (DERAEDT *et al.*, 1980). O sinal destes receptores para o sistema nervoso central ocorre

via fibras C aferentes sensoriais entrando no corno dorsal (COOLIER, DINNEN & SCHNEIDER, 1968).

Além disso, é bem estabelecido que a resposta nociceptiva causada pelo ácido acético também é dependente da liberação de algumas citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 8 (IL-8) modulada por macrófagos e mastócitos localizados na cavidade peritoneal (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Embora a inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético represente uma antinocicepção periférica (WIE, KIANG & BUCHAN, 1986), o modelo não possui especificidade, desde que uma diversidade de compostos farmacológicos, como antidepressivos tricíclicos (TAKAHANSHI & PAZ, 1987), anti-histamínicos (YEH, 1980) e anti-hipertensivos (PETTIBONE & MUELLER, 1981) inibem as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e mostram uma antinocicepção que pode ser questionada. Porém, mesmo sendo um modelo inespecífico, este é bastante utilizado para avaliar a atividade analgésica de várias substâncias de ação central e periférica. Um aspecto relevante é que a patologia da dor é uma resposta complexa, e os efeitos das substâncias não podem ser investigados em um único modelo experimental (COOLIER, DINNEN & SCHNEIDER, 1968), sendo necessários outros modelos de dor para confirmar a ação analgésica desta planta.

Como observado, não apenas os extratos induziram inibição significativa das contorções abdominais quando comparados ao controle, mas também os purificados isolados desses extratos XL e XLC, indicando uma atividade antinociceptiva. Dados da literatura demonstraram a atividade antinociceptiva de duas espécies da família Annonaceae, *Annona coriacea* Mart. (SOUSA, DEL-VECHIO-VIEIRA & KAPLAN, 2007) e *Duguetia lanceolata* St.-Hil (SOUSA, *et. al.* 2008) no mesmo modelo. Segundo os

autores o extrato metanólico de *Annona coriacea* e o extrato etanólico de *Duguetia lanceolata* foram capazes de reduzir as contorções abdominais pela inibição da síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase, sendo esta uma possível via de ação dos extratos e diterpenos de *X. langsdorffiana* (SOUSA, DEL-VECHIO-VIEIRA & KAPLAN, 2007; SOUSA, *et. al.* 2008).

Ainda foram realizados testes para avaliar potência e eficácia dos dois constituintes isolados de *Xylopiya langsdorffiana* e do fármaco padrão, a dipirona, de modo que foram testadas cinco doses das substâncias e do fármaco padrão para plotagem da curva-dose resposta (300 $\mu\text{mol/Kg}$, 100 $\mu\text{mol/Kg}$, 30 $\mu\text{mol/Kg}$, 10 $\mu\text{mol/Kg}$ e 1 $\mu\text{mol/Kg}$) e posterior cálculo da dose que inibe 50 por cento da resposta (DI_{50}). Como observado a DI_{50} do labdano (XL) foi 42,8 $\mu\text{mol/Kg}$, do trachilobano (XLC) foi de 17,41 $\mu\text{mol/Kg}$, já o fármaco padrão (dipirona) apresentou uma DI_{50} de 14,68 $\mu\text{mol/Kg}$. Assim comparando-se a DI_{50} da XL e XLC pode-se perceber que a XLC inibiu 50% das contorções com uma concentração menor que a da XL sugerindo que esta substância possui uma potência maior que a XL, sendo o valor da DI_{50} mais próximo ao da dipirona. A XLC também apresentou maior eficácia que a XL (**Figura 9**).

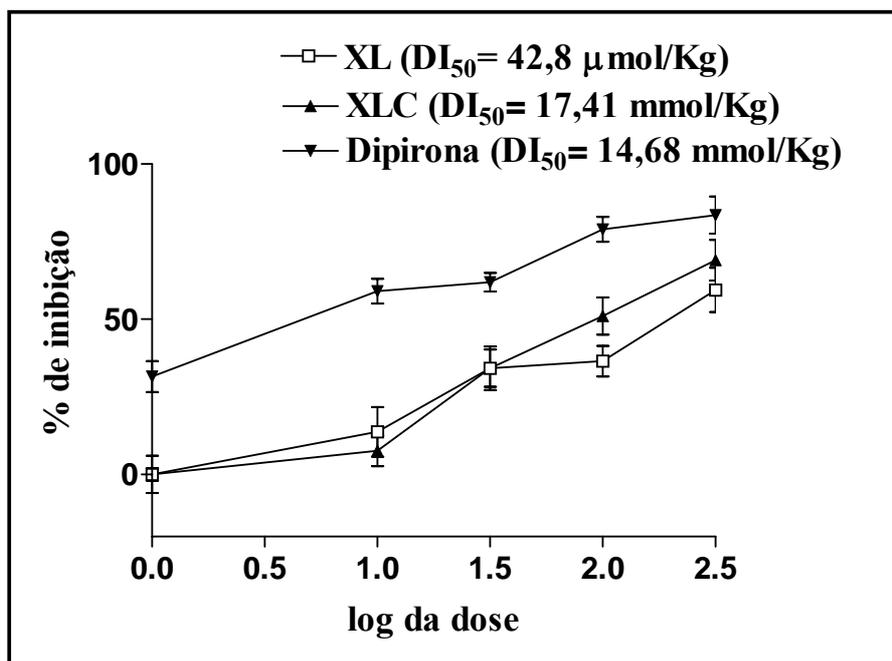


Figura 9- Curva dose – resposta da dipirona, XL e XLC em ensaio de nociceção induzida por ácido acético (*P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA).

4.1.2. Efeito dos EEt e ECl, XL e XLC no ensaio de nociceção induzida por formalina.

O teste de formalina é um método bastante utilizado para examinar a nociceção e sua modulação por fármacos, produtos naturais e substâncias sintéticas (DU *et al.*, 2007). Os resultados descritos na **Figura 10** mostram que EEt, ECl, XL, XLC, bem como a indometacina, fármaco padrão utilizado, inibiram significativamente o tempo de lambida na primeira fase do ensaio (fase neurogênica) quando comparados com o controle. O ECl induziu uma porcentagem de inibição de 79,4%, apresentando maior atividade que o EEt (40,12%), XL (41,52%), XLC (33,69%) e indometacina (29,82%).

O ECI também apresentou-se mais ativo na segunda fase do modelo, correspondente a fase inflamatória, com uma porcentagem de inibição de 83,7%. O EEt (62,7%), XL (44,1%), XLC (63,9%) e indometacina (59,3%) inibiram significativamente o tempo de lambida na segunda fase quando comparados ao controle.

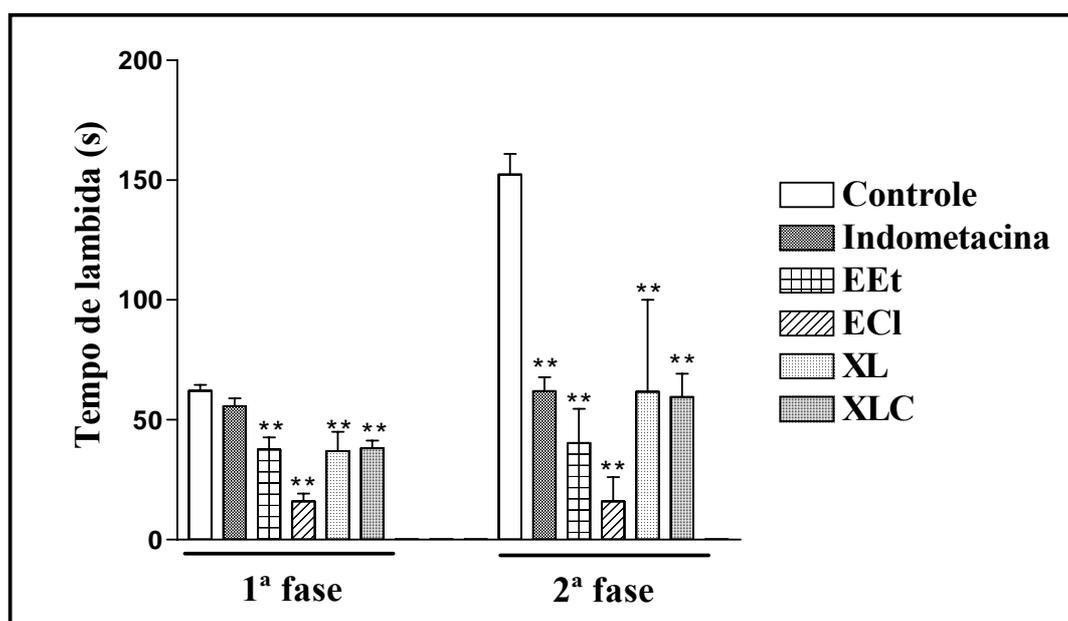


Figura 10- Efeito da indometacina (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), dos EEt e ECI (100 mg/Kg, i.p.), e dos diterpenos XL e XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) em ensaio de nociceção induzida por formalina. (** $P < 0,01$ foi considerado significativo ao nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).

A resposta nociceptiva induzida pela formalina apresenta duas fases que podem envolver diferentes mecanismos. A primeira fase (dor neurogênica) resulta da estimulação química direta das fibras aferentes nociceptivas mienilizadas e não mielinizadas (fibras-C), enquanto que a segunda fase (dor inflamatória) resulta da ação de mediadores inflamatórios liberados no tecido periférico e de mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal

espinhal que permitem, a facilitação da transmissão a nível espinhal (TJOLSEN *et al.*, 1992; DAI *et al.*, 2002). A segunda fase não pode ser interpretada como consequência da primeira fase. Por esta razão o teste de formalina é usado para avaliar a potência analgésica de substâncias, e também elucidar os mecanismos de analgesia na primeira (neurogênica) e na segunda fase (inflamatória) (HUNSKAAR & HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992).

Resultados experimentais têm indicado que a substância P e a bradicinina participam da primeira fase, que pode ser suprimida, principalmente, por analgesia de ação central, analgésicos opióides como a morfina; enquanto que na segunda fase, vários mediadores como: histamina, serotonina, bradicinina, aminoácidos excitatórios e prostaglandinas, podem estar envolvidos na dor inflamatória, que é muito sensível a ação dos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (TJOLSEN *et al.*, 1992; DAI *et al.*, 2002; SHIBATA *et al.*, 1989; HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Neste modelo os resultados mostraram que tanto EEt e ECl de *X. langsdorffiana*, como as substâncias XL e XLC, inibiram o tempo de lambida nas duas fases de forma significativa. Este resultado indica que os extratos e substâncias são efetivos não apenas na redução da dor neurogênica como também da dor inflamatória, podendo estar envolvido na inibição de vias centrais e periféricas de geração da dor. Os resultados demonstrados na primeira fase do modelo corroboram com os obtidos no ensaio de contorção abdominal induzidas por ácido acético, confirmando a atividade antinociceptiva dos extratos e substâncias.

4.1.3. Efeito dos EEt e ECI, XL e XLC no ensaio da placa quente

A atividade antinociceptiva central foi avaliada no ensaio de placa quente. Este modelo está relacionado a uma atividade primária na medula espinhal como também as áreas superiores de processamento central (YAKSH & RUDY, 1977). O tratamento dos animais com morfina, utilizada como padrão, causou um incremento na latência dos animais na placa nos tempos 60 e 90 min. Os grupos que receberam as substâncias XL e XLC e os EEt e ECI não tiveram aumento no seu limiar antinociceptivo quando analisados no teste da placa quente, mostrando que não foram efetivos em reduzir a nocicepção mediada por estímulos térmicos (**Tabela 1**).

Tabela 1: Efeito das substâncias XL e XLC (100 µmol/Kg, i.p.), EEt e ECI (100 mg/Kg, i.p.) e morfina (15 µmol/Kg, i.p.) no ensaio da placa quente.

Tratamento	Tempo (min)				
	0	30	60	90	120
Controle	1,8 ± 0,28	2,9 ± 0,82	2,1 ± 0,50	3,9 ± 0,76	3,4 ± 0,69
Morfina	1,9 ± 0,29	9,0 ± 1,40**	7,5 ± 0,58**	4,5 ± 0,5	2,8 ± 0,27
ECI	2,8 ± 0,39	2,5 ± 0,28	2,9 ± 0,50	3,1 ± 0,70	2,8 ± 0,74
EEt	1,3 ± 0,26	4,0 ± 0,55	4,1 ± 0,80	3,4 ± 0,32	2,7 ± 0,45
XL	2,5 ± 0,57	3,9 ± 0,83	3,3 ± 0,57	2,6 ± 0,48	2,2 ± 0,40
XLC	2,3 ± 0,30	2,0 ± 0,32	3,0 ± 0,60	2,8 ± 0,26	3,4 ± 0,70

Os dados representam a média e o erro padrão da média das leituras em segundos (** P<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

O calor é freqüentemente utilizado como um estímulo nociceptivo em modelo de dor aguda. O modelo da placa quente é muito conhecido por ser sensível a substâncias que atuam em nível central. O calor induz efeitos termocéptivos cutâneos e a integração do estímulo ocorre devido à estimulação de fibras C não-mielinizadas de condução lenta (HENDRY, HSIAO & BUSHNELL, 1999). Embora, o ensaio da placa quente seja comumente utilizado para testar analgésicos narcóticos, outras substâncias com atividade central, incluindo os sedativos e relaxantes musculares têm demonstrado atividade nesse teste (EDDY & LEIMBACH, 1953). Entretanto, em contraste ao efeito da morfina, a indometacina e outros antiinflamatórios não esteroidais, não apresentam nenhum efeito neste ensaio (SANTOS, VEDANA & FREITAS, 1998).

Estudos recentes sugerem a participação de mecanismos periféricos na transmissão da resposta térmica. Assim além do TRPV1 (receptor vanilóide tipo 1), outros receptores como o VLR-1 (receptor relacionado ao VR-1) e o ASIC (canal iônico ativado pelo estiramento) foram clonados e identificados como proteínas termocéptoras. A ativação destas proteínas causa influxo de íons em neurônios sensoriais, iniciando o processo de condução da informação nociceptiva térmica (REICHILING & LEVINE, 2000). A observação de que EEt e ECI *X. langsdorffiana*, bem como os diterpenos XL e XLC não induziram um aumento do tempo de latência dos animais na placa quente, sugere que estes não apresentam atividade antinociceptiva central.

4.2. Estudo da atividade antiinflamatória

4.2.1. Efeito da XL e XLC no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.

O edema de orelha como um modelo de medida de inflamação induzido por capsaicina está bem caracterizado em vários artigos (INOUE, NAGATA & KOSHIHARA, 1993). Utilizando este ensaio foi possível determinar que não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de inibição do edema, da indometacina, fármaco padrão utilizado no ensaio, e dos diterpenos XL e XLC em suas diferentes concentrações testadas (exceto a XLC na concentração de 0,3 $\mu\text{mol/Kg}$) (**Figura 11**).

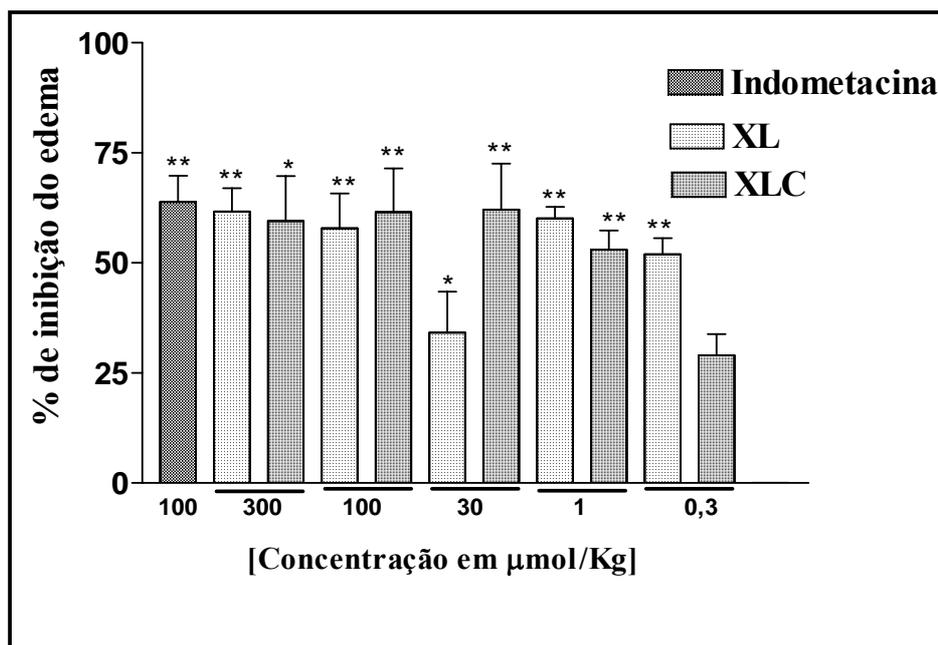


Figura 11- Efeito das substâncias XL, XLC e indometacina (100 μmol/Kg, i.p.) em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. (**P<0,01, *P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet, quando comparados com o controle positivo – animal tratado com capsaicina).

Utilizando a capsazepina, um antagonista de receptor vanilóide, investigamos o efeito das substâncias e extratos nesse sistema. Os resultados mostraram que quando a XL e a capsazepina foram administradas concomitantemente, essas foram capazes de inibir de forma significativa o edema de orelha causado pela capsaicina. Quando apenas a XL foi administrada, esta também foi capaz de inibir significativamente o edema de orelha. No entanto a comparação das inibições do edema causadas pela XL e capsazepina e apenas XL, demonstrou que o grupo tratado com XL e capsazepina induziu uma maior inibição do edema de orelha, na ordem de 78,71%, sendo a inibição apenas na presença da XL de 50,08%. Este resultado indica um efeito sinérgico entre a XL e a capsazepina, sugerindo

mecanismos de ação diferentes para estas duas substâncias. Portanto, com este dado podemos sugerir que a XL pode exercer efeito antinociceptivo por uma via distinta da capsezipina. Já a XLC administrada simultaneamente com a capsezipina foi capaz de induzir uma inibição significativa do edema de orelha, o que também foi observado quando apenas a XLC foi administrada. A comparação entre os grupos tratados com XLC e capsezipina (72,74% de inibição) e apenas XLC (61,54% de inibição) mostrou que não houve diferença significativa entre eles embora exista uma menor inibição quando a XLC é administrada sozinha, o que também sugere mecanismos de ação distintos e, portanto estão atuando de forma sinérgica para inibir o edema de orelha induzido por um ativador de receptor vanilóide, a capsaicina (**Figura 12**).

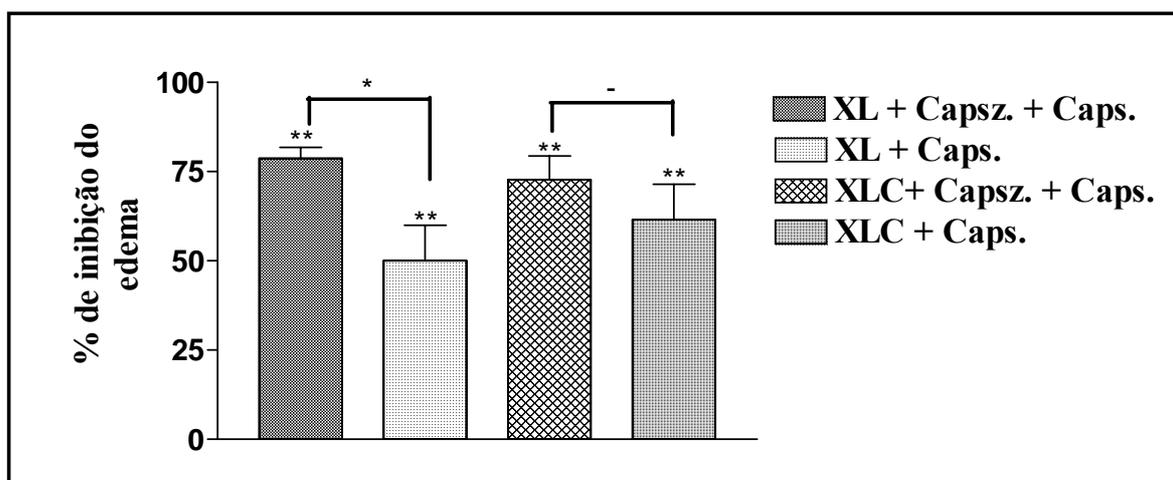


Figura 12- Efeito das substâncias XL e XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) e capsazepina (0,2 mg/orelha) em ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina. (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet, quando comparados com o controle positivo – animal tratado com capsaicina ou teste t de Student).

O modelo de edema de orelha induzido por agentes irritantes, tal como a capsaicina é válido para o estudo de compostos com potencial antialérgico e atividade antiinflamatória local. Muitas classes de fármacos, tais como: antagonistas da bradicinina, antihistaminérgicos, antiserotoninérgicos, agentes antiinflamatórios não-esteroidais e antagonistas dos receptores vanilóides, semelhantes a capsazepina e vermelho de rutênio podem modelar a resposta ao edema de orelha dependendo da natureza da substância edematogênica (STERNER & SZALLASI, 1999).

A capsaicina, substância álgica de ocorrência natural derivada de plantas da família Piperaceae, possui um importante papel no estudo do funcionamento das fibras sensoriais C e Aδ aferentes, tendo em vista a sua ação nos nociceptores polimodais e termocceptores (PIETROVSKI *et al.*, 2006). Foi proposto que a nocicepção induzida pela capsaicina é conseguida através da ativação de um receptor responsivo a capsaicina, também conhecido como receptor vanilóide (TRPV), denominado TRPV1. Este receptor é um canal ionotrópico não-seletivo para cátions, presentes nos neurônios sensoriais primários (CATERINA *et al.*, 1997; RANG *et al.*, 2007). Estudos têm mostrado que a capsaicina provoca a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e mediadores pró-inflamatórios nos nervos periféricos e que esta informação nociceptiva é transmitida para a medula espinhal (SZALLASI & BLUMBERG, 1999).

As substâncias XL e XLC foram capazes de inibir o edema de orelha causado pela capsaicina em todas as doses testadas (exceto XLC na dose de 0,3 µmol/Kg). Além disso, possivelmente há um efeito sinérgico entre a XL e a capsazepina e entre a XLC e a capsazepina o que indica que essas substâncias podem estar atuando por vias distintas para inibir o edema causado pela capsaicina. Não é totalmente descartada a idéia de que a XL e

XLC possam também agir como inibidor do receptor vanilóide. Entretanto, apenas estudos utilizando “binding” específico podem responder esta questão

4.2.2. Efeito dos EEt e ECl, XL e XLC no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A

Peritonite induzida por zymosan A em camundongos é um modelo de inflamação amplamente utilizado e muito bem caracterizado (DOHERTY *et al.*, 1985). A migração celular foi reduzida de forma significativa após seis horas da administração de Zymosan A pela indometacina, XL, XLC, EEt e ECl, quando comparados com o controle (**Figura 13**). A indometacina, antiinflamatório não esteroideal utilizado como padrão, induziu uma maior inibição da migração celular (59,61%), seguida do ECl (51,97%), XLC (49,51%), EEt (42,51%) e XL (36,40%).

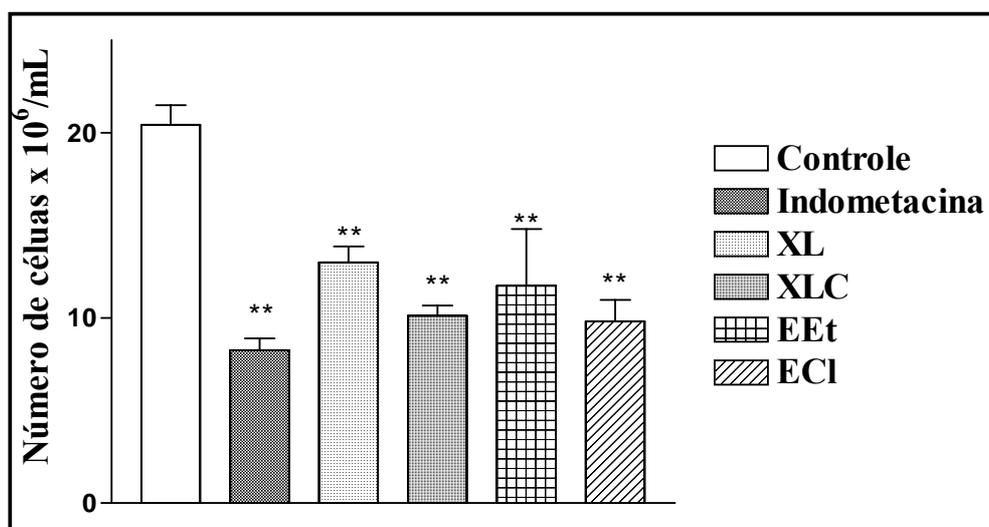


Figura 13- Efeito da XL e XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), EEt e ECI (100 mg/Kg , i.p.) e indometacina (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) em ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. (** $P < 0,01$ foi considerado significativo no nível de 99% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnet).

O Zymosan A é um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Sacharomyces cerevisiae* capaz de induzir a degranulação de mastócitos, liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, e é capaz de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico e ativar a via alternativa do sistema do complemento. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo induz um aumento no extravasamento vascular, um dos sinais preliminares da inflamação (RAO *et al.*, 1994; BOUGHTON-SMITH & GHELANI, 1995). Esta é uma etapa chave na formação do exsudado inflamatório e é seguida por um recrutamento tempo dependente de células, especialmente neutrófilos (DOHERTY *et al.*, 1985). O resultado obtido permite afirmar que esses extratos e substâncias possuem atividade antiinflamatória, confirmando os resultados observados na

segunda fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina e edema de orelha induzido por capsaicina.

4.2.3. Efeito da XLC no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund

A artrite foi estabelecida em todos os ratos pela administração do adjuvante completo de Freund após 14 dias da administração. Os animais controles não apresentam nenhuma alteração no diâmetro da pata, uma vez que estes foram administrados apenas com salina (**Figura 14 A**). Nos animais que receberam o adjuvante observou-se inflamação na pata administrada, (**Figura 14 B**). Para determinar o efeito do tratamento com XLC sobre o desenvolvimento da artrite, a substância foi administrada durante 7 dias a partir do dia 14 após a indução da artrite. O tratamento i.p. com a XLC não causou uma inibição estatisticamente significativa do aumento de volume da pata quando comparada ao controle positivo, tendo sido observado uma inibição de forma significativa apenas no dia 16. O fármaco padrão utilizado, talidomida, foi capaz de inibir o aumento de volume da pata significativamente nos dias 16, 17, 18 e 21 (**Figura 15**).

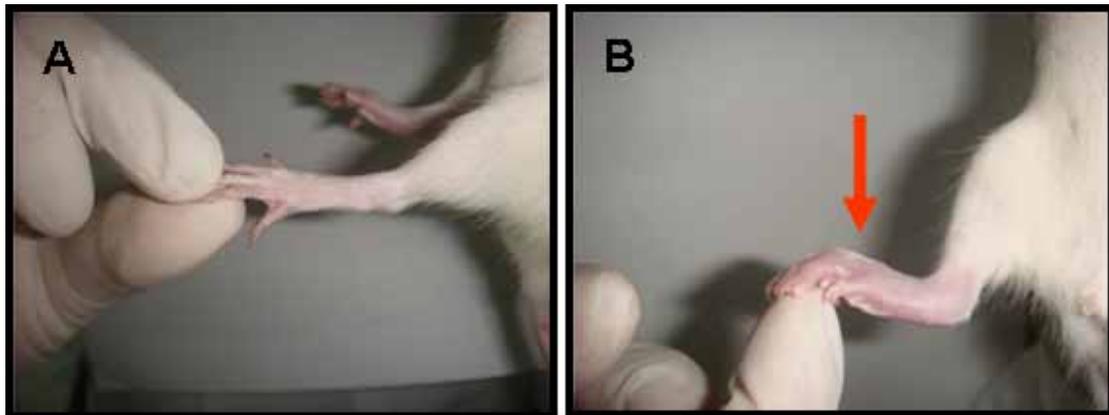


Figura 14- Pata do animal Controle–animal normal (A) e animal artrítico-administrado com adjuvante (B) após 14 dias de indução da síndrome, → eritema e edema na pata direita do animal artrítico causados pela administração do adjuvante completo de Freud's.

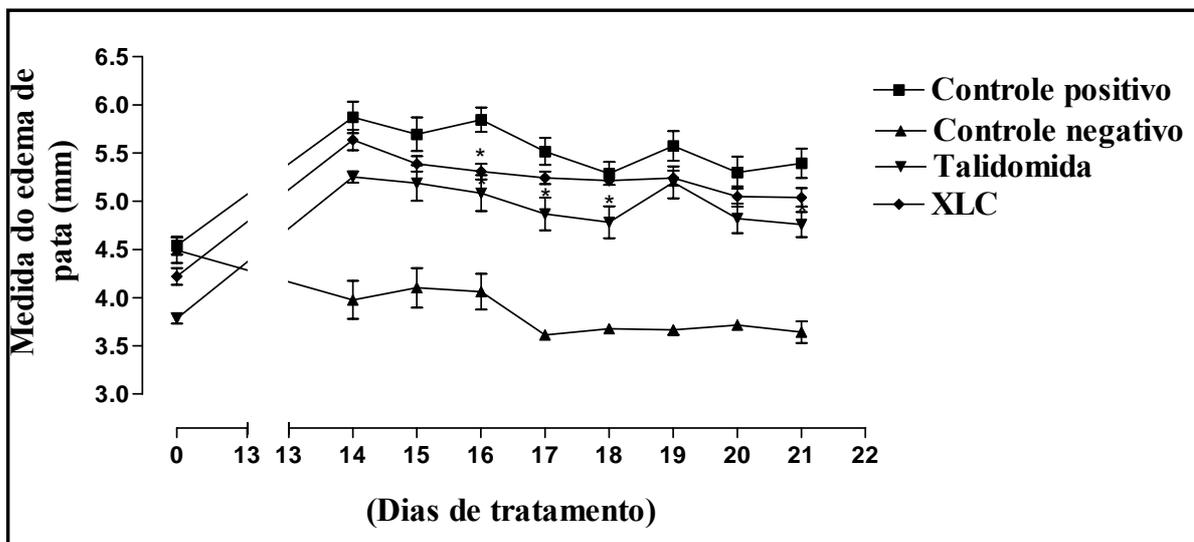


Figura 15- Efeito da XLC (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.) e talidomida (100 $\mu\text{mol/Kg}$, i.p.), em ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (* $P < 0,05$ foi considerado significativo no nível de 95% de confiança no teste de ANOVA, seguido do teste de Dunnett).

O modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos é amplamente utilizado para avaliação da atividade antiinflamatória crônica de diversos compostos. É um experimento imuno-patológico que apresenta características semelhantes a artrite reumatóide em humanos. Neste modelo, a artrite se desenvolve dentro de duas semanas e é caracterizada pela redução do peso corporal, edema de pata, bem como o desenvolvimento de lesões inflamatórias. A artrite reumatóide é uma desordem sistêmica auto-imune caracterizada por hiperplasia sinovial e inflamação crônica. Embora as causas exatas da artrite reumatóide permaneçam desconhecidas, desregulação imunológica por citocinas inflamatórias podem estar envolvidos no seu desenvolvimento (WANG *et. al.*, 2005).

Na artrite reumatóide são produzidos altos níveis de IL-1 e TNF- α , que desempenham papéis essenciais na progressão da destruição conjuntiva e proliferação da membrana sinovial. Estudos demonstraram que a IL-1 e TNF- α reforçam a proliferação de fibroblastos, estimulam a produção de PGE2, aumento da expressão de citocinas e colágeno por células sinoviais. O TNF- α exerce a sua atividade através da indução de IL-1. Assim, a IL-1 e TNF- α são dominantes na indução de inflamação e erosão óssea. Prostaglandinas estão envolvidas em uma série de atividades biológicas relevantes para a patogênese da AR. Estudos sugerem que alguns dos aspectos pró-inflamatórias da doença são mediados por PGE2. A neutralização da PGE2 com anticorpos monoclonais reduziram tanto os sinais inflamatórios quanto os níveis de marcadores de doença (XU *et. al.*, 2007). Quimiocinas, como CCL2 e CCL5, também desempenham um papel importante na patogênese da reumatóide artrite (XU *et. al.*, 2007; KAPLAN *et al.*, 2002). Os resultados mostraram que a XLC não foi eficiente ao inibir o edema característico da artrite induzida por adjuvante.

4.3. Efeito dos EEt e ECl, XL e XLC no ensaio de toxicidade aguda

Para a avaliação da toxicidade aguda dos EEt e ECl (500 mg/Kg, i.p.) e dos diterpenos XL e XLC (500 μ mol/Kg), morbidade e mortalidade foram monitoradas durante 72 h após a administração dos mesmos. Os animais tratados com as substâncias XL e XLC permaneceram ativos durante todo o período, sem apresentar sinais de toxicidade ou morte durante um período de 72 h. Já o EEt induziu a morte de 50% dos animais após 24 h de experimento, e os que não morreram ficaram letárgicos. Os animais tratados com ECl tiveram 100% de morte antes de 24 h de experimento. Através destes resultados pode-se afirmar que os extratos de *X. langsdorffiana* apresentam uma toxicidade na dose de 500 mg/kg, já as substâncias isoladas não apresentam toxicidade na concentração de 500 μ mol/kg.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitem concluir que não apenas os extratos etanólico e clorofórmico de *Xylopiia langsdorffiana* possuem atividade antinociceptiva, mas também seus isolados XL (proveniente do extrato etanólico) e XLC (proveniente do extrato clorofórmico), dados demonstrados através dos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina. A XLC apresentou maior potência, como evidenciada pelo cálculo da DI_{50} no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético e também maior eficácia que a XL.

Nenhuma das substâncias (XL e XLC) ou extratos (EEt e ECl) apresentaram atividade antinociceptiva central, verificada através do ensaio da placa quente. Uma provável atividade antiinflamatória também foi observada no modelo de nocicepção induzida por formalina, modelo de migração celular induzida por Zymosan A e edema de orelha induzido por capsaicina. A substância XLC não apresentou atividade antiinflamatória em modelo crônico de inflamação (artrite). Os extratos EEt e ECl apresentaram toxicidade quando administrados na dose de 500 mg/kg, o que não foi observado com a administração das substâncias XL e XLC na dose de 500 μ molKg.

De posse destes resultados pode-se concluir que os extratos bem como os diterpenos XL e XLC, são capazes de modular a resposta nociceptiva e inflamatória aguda, no entanto essas substâncias apresentaram efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, V.U.; HUSSAIN, H.; BURKHARI, I.A.; HUSSAIN, J; JASSBI, A.R.; DAR, A. Antinociceptive diterpene from *Euphobia decipiens*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 230-232, 2005.
- AKKOL, E.K.; YESILADA E.; GUVENÇ, A. Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. **J Ethnopharmacol.**, v.116, p. 251–257, 2008.
- ASEKUN, O. T.; ADENIYI, B. A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopia aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, p. 368-370, 2004.
- BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. Percepção da Dor. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. **Princípios da Neurociência** , 4 ed., São Paulo, Manole, 2004.
- BASTOS, G.M. Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas . 2007. 107f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Farmácia, odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência- Desvendando o Sistema Nervoso**, Proto Algre, 2^a ed, Artmed Editora, 2002.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, n. 353, p.610-615, 1999.
- BORELLI, F.; CAPASSO, R.; CAPASSO, F. Herbal remedies: promises with risk. **Nat. Prod. Comm.**, v.1., n.1., p.77-79, 2006.
- BOUGHTON-SMITH, N. K.; GHELANI, A. Role of induced nitric oxid synthase and increased NO levels in zymozan peritonitis in the rat. **Inflamm Res Supplement.**, n.2, p. 149-150, 1995.
- BRENOL, C. V.; MONTICIELO, O. A.; XAVIER, R. M.; BRENOL, J. C. T. Artrite reumatóide e arteroesclerose. **Rev Assoc Med Bras.**, n. 56, p. 465-470, 2007.

BROOKS, J.; TRACEY, I. From nociception to pain perception. Imaging the spinal and supraspinal pathways. **J Anat.**, n. 207, p. 19-33, 2005.

BRUMMITT, R. K. **Vascular Plant - Families and Genera**, p. 491, 1992.

CALIXTO, J.B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal review. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSE, F.; POUPON, M.F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Lett.**, v. 215, p. 53-59, 2004.

CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CHADWICK, D. J.; Mrsh, J. (Editors). **Bioactive Compounds from Plants**. John Wiley, New York, 1990.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cicloxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p13926- 13931, 2002.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). In: SMITH, N. et al. (eds.). **Flowering Plants of Neotropics**. New York: New York Botanical Garden, p. 8-20, 2004.

COLLINS, T. Inflamação Aguda e Crônica. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

COLMAN-SAZARITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, N. R. Bioactive Annonaceous Acetogenins From The Bark of *Xylopia aromatica*. **J Nat Prod.**, v. 57, p. 486-493, 1994.

COOLIER, H. O. J.; DINNEN, L. C.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in mice. **Br J Pharmacol.** 32: 285 – 310, 1968.

CORREA, M.P. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil**, p. 315, 1984.

CORREIA, R. C.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 receptor in formaline induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol.**, v. 110, p. 193, 1993.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**, New York: Columbia University Press, p. XIII- XVIII, 1981.

DAI, Y.; YE, W.C.; WANG, Z.T.; MATSUDA, H.; KUBO, M.; BUT, P.P.H. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L.in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 245-250, 2002.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Eur J Pharmacol.**, v. 61, p. 17–24, 1980.

DO VALE, T.G.; FURTADO, E.C.; SANTOS, J.G.; VIANA, G.S. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill). **Phytomedicine**, v.9, p. 709-714, 2002.

DOHERTY, N. X; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2.

Prostaglandins, v. 30, p. 769–789, 1985.

DU, J.; YU, Y.; KE, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z.M. Ethnopharmacological communication: Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **J Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 211–214, 2007.

DZEROSKI, S.; SCHULZE-KREMER, S.; HEIDTKE, K.; SIEMS, K.; WETTSCHERECK, D.; BLOCKEEL, H. Diterpene structure elucidation from ¹³C NMR spectra with inductive logic programming. **Applied Artificial Intelligence**, v. 12, p. 363-384, 1998.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 107, p. 385–393, 1953.

EMERY, P.; ZEIDLER, H.; KVIEN, T. K.; GUSLANDI, M.; NAUDIN, R.; STEAD, H.; VERBURG, K. M.; ISAKSON, P. C.; HUBBARD, R. C.; GEIS, G. S. Celecoxibe vesus diclofenac in long-term management of rheumatoid arthritis: randomized double-blind comparison. **Lancet**, v. 354, p 2106-2111, 1999.

FELÍCIO, J.D.; ROQUE, N.F. Constituição Química dos Frutos de *Xylopia amazonica* In: 41º Reunião Anual da SBPC, p. 519, 1989.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; DE CAMPOS, D. I. Induction blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**. v. 42, p.365, 1990.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE S. Bradykinin initiates citokine-mediated inflammatory hiperalgesia. **Br J Pharmacol.**, v. 110 p. 1227, 1993.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência do processo redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 48, p. 17-24, 2008.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? **J Exp Med.**, v. 201, n. 5, p. 671-674, 2005.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE C. O fator de transcrição NF-kB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 22, p. 26-30, 2000.

GUEDES, M.M. Estudo dos efeitos antinociceptivos e gastrintestinais do extrato hidroalcoólico de *Egletes viscosa* Less e seus constituintes diterpenóides. 2002. 116f. Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

GUEDES, M.M.; CUNHA, A.N.; SILVEIRA, E.R.; RAO, V.S.N. Antinociceptive and gastroprotective effects of diterpenes from the flower buds of *Egletes viscos*. **Planta Med.**, v. 68, p. 1044-1046, 2002.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O.; Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre-Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

HARBONE, J.B.; BAXTER, H. **Phytochemical dictionary**: a handbook of bioactive compounds from plants. London: Taylor Francis, 1995.

HARRIGAN, G. G.; BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. Kaurane and trachylobane diterpenes from *Xylopi aethiopica*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 109-113, 1994.

HENDRY, S.H.C. ; HSIAO, S.S. ; BUSHNELL, M.C. Somatic sensation. In: ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. (EDS.), **Fundamental Neuroscience**, p. 768–769, 1999.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs N.S., 1985.

HIRUMA-LIMA, C.A.; TOMA, W.; GRACIOSO, J.D.E.S.; DE ALMEIDA, A.B.; BATISTA, L.M.; MAGRI, L.; DE PAULA, A.C.; SOARES, F.R.; NUNES, D.S.; SOUZA-BRITO, A.R. Natural trans-crotonin: the antiulcerogenic effect of another diterpene isolated from the bark of *Croton cajucara* Benth. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 4, p. 452-456, 2002.

HUNSKAAR, S. & HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain** 30: 103-114, 1987.

HUTCHINSON, J. **The families of flowering plants**, Oxford, Clarendon Press, p. 22-168, 1973.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid- induced ear oedema. **Br J Pharmacol.**, v. 110, n. 4, p. 1614-1620, 1993.

IWAMOTO, M.; OHTSU, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; MATSUNAGA, S; TANAKA, R. Anti-tumor promoting diterpenes from the stem bark of *Thuya standishii* (Cupressaceae). **Bioorg Med Chem.**, v. 9, p. 1911-1921, 2001.

KAUFMAN, P.B.; CSEKE, L.J.; WARBER, S.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. **Natural Products from Plants**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.

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

- KUPELI, E.; ERDEMOGLU, N.; YESILADA, E.; SENER, B. Antiinflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L. **J Ethnopharmacol**, v.8, p. 265-270, 2003.
- LA CRUZ, M.G. de. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no Estado de Mato Grosso. Relatório da Secretaria do Estado da Saúde, Governo do Estado do Mato Grosso, 2005.
- LAGO, J. H. G.; MOREIRA, I. C.; TANIZAKI, T. M.; MORENO, P. R. H.; ROQUE, N. F.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Mono and Sesquiterpenes from the Leaf Essential Oil of *Xylopiya brasiliensis* Spreng. (Annonaceae). **J Essent Oil Res.**, v. 15, p. 406-407, 2003
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783, 1982
- LIEBGOTT, T.; MIOLLAN, M.; BERCHADSKY, Y.; DRIEU, K.; CULCASI, M.; PIETRI, S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituent of Ginkgo biloba extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. **Basic Res Cardiol.**, v. 95, p 368-377, 2000.
- LIMA-JUNIOR, R.C.; OLIVEIRA, F.A., GURGEL, L.A.; CAVALCANTE, I.J.; SANTOS, K.A., CAMPOS, D.A.; VALE, C.A.; SILVA, R.M.; CHAVES, M.H. RAO, V.S.; SANTOS, F.A. Attenuation of visceral nociception by alpha- and beta-amyrin, a triterpenoid mixture isolated from the resin of *Protium heptaphyllum*, in mice. **Planta Med.**, v. 72, n. 1, p. 34-39, 2006.
- LOBÃO, A. Q.; ARAÚJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

MAAS P. J. M.; H.M.-V.D. KAMER, L. JUNIKKA, R. D. MELLO-SILVA and H. RAINER: Annonaceae from Central-eastern Brazil, **Rodriguésia**, v. 52, p. 65, 2001.

MACÊDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais utilizadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 14, p. 40-44, 2004.

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

MADUREIRA, A.M.; ASCENSO, J.R.; VALDEIRA, L.; DUARTE, A.; FRADE, J.P.; FREITAS, G.; FERREIRA, M.J. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphobia segetalis*. **Nat Prod Res.**, v. 17, p. 375-380, 2003.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A. C. M.; OLIVEIRA, J.; CARREIRA, L. M. M.; ARAÚJO, J. S. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopi*a species. **Flavour Fragr J.**, v. 20, p. 474-477, 2005.

MCMURRAY, R. W.; HARDY, K. J. COX-2 inhibitors: today and tomorrow. **Am J Med Sci.**, v. 323, n. 4, p. 181-189, 2002.

MEDEIROS, J.D. A biotecnologia e a extinção de espécies, Crise da modernidade. **Rev Biotec Ciência e Desenv.**, 30. ed., 2003.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G., **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. São Paulo: Robe Editorial, 2000.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, n. 1p. 164, 1999.

MOREIRA, I. C. Estudo químico de *Xylopi*a *emarginata* e *Xylopi*a *brasiliensis* São Paulo, 203p. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 1999.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.;LAGO, J. H. G., Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiya emarginata* (Annonaceae). **Rev Bras Farmacogn.**, v. 17, p. 55-58, 2007.

NASCIMENTO A. A.; RIBEIRO, E. A. N.; OLIVEIRA, J. M.; MDEIROS, F. A.; SILVA, M. S.; MEDEIROS, I. A. Cardiovascular effects induced by the hydroalcoholic extract of the stem of *Xylopiya cayennensis* in rats. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 17-21, 2006.

NES, W.D.; ZHOU, W. **Terpenoids**: Higher, 2001. In: Encyclopedia of Life Sciences, London: Nature Publishing Group, Disponível em: <http://www.els.net>, acesso em 12/12/2008.

NEWBOULD, BB. Chemotherapy of arthritis induced in rats by mycobacterial adjuvant. **Br J Pharmacol Chemoth.**, v. 21, p. 127-136, 1963.

NIV, D.; KREITLER, S. Pain and Quality of Life. **Pain Practice**, v. 1 p. 150-161, 2001.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: Importância Química e Farmacológica. **Quim. Nova**, v.29, n.3, p. 549-554, 2006.

NOVAES, G. S.; MELLO, S. B. Atividade das enzimas ciclooxigenase e drogas anti-reumáticas modificadoras de doença. **Rev Bras Reumatol.**, v. 40, n. 2, p. 43-54, 2000.

OLIVEIRA, A.P.; FURTADO, F.F.; SILVA, M.S.; TAVARES, J.F.; MAFRA, R.A.; ARAÚJO, D.A.M.; CRUZ, J.S.; MEDEIROS, I.A. Calcium channel blockade as a target for the cardiovascular effects induced by the 8 (17), 12E, 14-labdatrien-18-oic acid (labdane-302). **Vasc Pharmacol.**, v. 44, p. 338–344, 2006.

OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; LIMA-JÚNIOR, R.C.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. Trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **J Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 103-108, 2005.

PATRIGNANI, P.; TACCONELLI, S.; SCIULLI, M. G.; CAPONE, M. L.; New insights into COX-2 biology and inhibition. **Brain Res Rev.**, v. 48, n. 2, p. 352-359, 2004.

PETTIBONE, D.J.; MUELLER, G.P. Alpha adrenergic stimulation by clonidine increases plasma concentration of immunoreactive beta-endorphin in rats. **Endocrinology**, v. 109, p. 789-802, 1981.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A. R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacol Biochem Behavior.**, v. 83, p. 90-99, 2006

PRADO, P. T. C.; DEL BEL, E. A. C-*fos*, an immediate early gene as a neuromarker for nociception. **Medicina Ribeirão Preto**, v.31, p.424-433, 1998.

RAJIC, A.; KWEFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, D.S.; POLYA, G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids. **Planta Med.**, v. 66, p. 206-210, 2000.

RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. Hormônios locais, inflamação e alergia. In: RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**, 6^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. Fármacos analgésicos. In: RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**, 6^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

RAO, T. S., CURRIE, J. L., SHAFTER, A. F., ISAKSON, P. C. In vivo characterizations of zymozan-induced mouse peritoneal inflammation. **J. Pharmacol Exp Ther.**, v. 269, n.3, p. 917-925, 1994.

REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. In hot pursuit of the elusive heat transducers. **Neuron.**, v. 26, p. 555-558, 2000.

REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre-Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

RIBEIRO, L.A.A.; TAVARES, J. F.; DE ANDRADE, N.C.; SILVA, M.S.; SILVA, B.A. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopiya langsdorffi ana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Braz J Pharmacogn.**, v. 17, p. 197-203, 2007.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 387, p. 111–118, 2000.

ROBBERS, J.E.; TYLER, V.E.; SPEEDIE, M.K. **Pharmacogn. Pharmacobiotec**. New York: Wiliam & Wilkim, 1997.

ROCHA, B. A., SILVA, J. B. e PANNIZA, S. Anatomy and Essential Oil of *Xylopiya frutescens* Aublet, Fruit. **Rev Cienc Farm.**, v. 2, p. 101, 1979.

- RUPRECHT, J. K.; HUI, Y. H. MC LAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **J Nat Prod.**, v. 53, p. 237-278, 1990.
- SANCHEZ, T., MORENO, J.J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostagl Other Lip Med**, v. 57, p. 119-31, 1999.
- SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, p. 302–307, 1998.
- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.
- SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1984.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.
- SIANI, A.C.; MICHILES, E., Medicamentos de Origem Vegetal: Cenário atual de desenvolvimento, produção e mercado. **Fármacos e Medicamentos**, n.37, ano VI, p.14-18, 2005.
- SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; RAO, V.S.N. Effects of trans-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Cróton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by Triton WR 1339 (Tyloxapol) in mice. **Planta Med.**, v. 67, p. 1-3, 2001.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre-Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de Folhas de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Lat Am J Pharm.**, v. 26, p. 872-877, 2007.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; AMARAL, M. P. H.; PINHO, J. J. R.G.; YAMAMOTO, C. H.; ALVES, M. S. Efeitos Antinociceptivo e Antiinflamatório do Extrato Etanólico das Folhas de *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae). **Lat Am J Pharm.**, v. 27, p. 398-402, 2008.

STERNER, O.; SZALLASI, A. A novel natural vanilloid receptor agonists: new therapeutic targets for drug development. **Trends Pharm Sci.**, v. 20, p 459-465, 1999.

SZALLASI, R.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacol.**, v. 51, p. 159-212, 1999.

TAKAHASHI, R.N.; PAZ, M.M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Braz J Med Biol Res.**, v. 20, p. 607-610, 1987.

TAVARES, J.T.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M.V.B.; DINIZ, M.F. F. M., FILHO, J.M.B.;

DA-CUNHA, E.V. L.; SIMONE, C.A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; MELO, P.S.; HAUN, M.; SILVA, M.S. *ent*-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **J Nat Prod.**, v. 69, p. 960-962, 2006.

THOMAS, O. O. **Fitoterapia**, v. LX, p. 147-155, 1989.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J. (Eds.), **Pharmacol Pain**, v. 130, p. 1–20, 1997.

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

TORRES, L.M.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from baccharis trimera with a relaxant effect on a rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

VANE, J. R.; CORIN, R. E. Prostacyclin: a vascular mediator. **Eur J Vasc Endovasc Surg.**, v. 26, n. 6, p. 571-578, 2003.

VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; Os Produtos Naturais e a química Medicinal Moderna, **Quím. Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on the direct spinalaction of narcotics in the production of analgesia in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 202, p. 411-428, 1977.

YEH, S.Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripelenamine in the rat. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 35, p. 638-701, 1980.

WANG, G.J.; WU, X.C.; LIN, Y.L.; REN, J.; SHUM, A.Y.; WU, Y.Y.; CHEN, C.F. Ca²⁺ channel blocking effect of isosafrole in rat smooth muscle cells. **Eur J Pharmacol**, v. 445, p. 239-245, 2000.

WANG, Y.; FANG, Y.; HUANG, W.; ZHOU, X.; WANG, M.; ZHONG, B., PENG, D. Effect of sinomenine on cytokine expression of macrophages and synoviocytes in adjuvant arthritis rats. **J Ethnopharmacol.**, v. 98, p. 37–43, 2005.

WAHI, A.; ROBLLOT, F.; CAVE, A. Isolation and Structure Elucidation of Xylobuxin, A New Neolignan from *Xylopi buxifolia*. **J Nat Prod.**, v. 54, p. 786-789, 1995.

WIE, E.T.; KIANG, J.G.; BUCHAN, P. Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 238, p. 783-787, 1986.

Xu, H.M.; Wei, W.; Ji, X.Y.; Chang, Y.; Zhang, L. Effects and mechanisms of total glucosides of paeony on adjuvant arthritis in rats. **J. Ethnopharmacol.** v. 109, p. 442-448, 2007.

ZHANG, C.F.; WANG, D.S.; LING, X.Z. Diacetylamethystoidin A protects isolated working rat heart against myocard reperfusion injury. **Zhongguo Yao li Xue Bao**, v. 17, p. 245-248, 1996.

ZIMMERMAN, M., Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain** 16, 109-10, 1983.