

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

**JAMYLLÉ NUNES DE SOUZA FERRO**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO  
HEXÂNICO OBTIDO DAS CASCAS DO CAULE DE *Clusia nemorosa* G. Mey.  
(Clusiaceae)**

**Orientador: EMILIANO DE OLIVEIRA BARRETO**

**Maceió – 2012.**

**JAMYLLLE NUNES DE SOUZA FERRO**

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO  
HEXÂNICO OBTIDO DAS CASCAS DO CAULE DE *Clusia nemorosa* G. Mey.  
(Clusiaceae)**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde sob orientação do professor Dr. Emiliano de Oliveira Barreto.

**Maceió – 2012.**

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos**

- F395a Ferro, Janylle Nunes de Souza.  
Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico obtido das cascas do caule do *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) / Janylle Nunes de Souza Ferro. – 2012.  
77 f. : il., tab.
- Orientador: Emiliano de Oliveira Barreto.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2012.
- Bibliografia: f. 68-77.
1. Plantas medicinais. 2. *Clusia nemorosa*. 3. Antinocicepção. 4. Friedelina.  
I. Título.

CDU: 615.322:615.276



**Ata da Defesa da Dissertação de Mestrado da mestrandia  
Jamyllle Nunes de Souza Ferro**

Aos 30 dias do mês de março de 2012, às 9h horas, reuniram-se no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da UFAL, os membros da Banca examinadora da Defesa da Dissertação da mestrandia **JAMYLLLE NUNES DE SOUZA FERRO**, regularmente matriculada no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, em nível mestrado, orientada pelo Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto. A Banca examinadora foi composta pelos professores doutores Valber da Silva Frutuoso, Êrica Adélia Nogueira Ribeiro e Robinson da Silva Sabino. Após a apresentação por 30 (horas/minutos) da dissertação intitulada "Atividade antinociceptiva do extrato hexânico obtido a partir das cascas do caule de *Clusia nemorosa* Mey. (Clusiaceae)", a mestrandia foi arguida pela banca na seguinte ordem: Valber da Silva Frutuoso, Êrica Adélia Nogueira Ribeiro e Robinson da Silva Sabino, reunidos em sessão secreta às 9:00 horas, os examinadores consideraram a mestrandia APROVADA. Para constar foi lavrada a presente ata que depois de lida e aprovada foi assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Valber da Silva Frutuoso  
Êrica A. N. Ribeiro  
Robinson Sabino

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde/ICBS, da Universidade Federal de Alagoas/UFAL, sob orientação do Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto, em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais/ LPqPN, sob a co-orientação da Profa. Dra. Lúcia Maria Conserva e com a Plataforma de Métodos analíticos PDTIS/FIOCRUZ/RJ.

Dedico essa conquista à Sagrada Família pelo eterno amparo, por acalantar meu coração e por me fazer merecedora de todas as dádivas que recebo diariamente.

A meus pais, Ernando e Jane, e minhas irmãs, Jullyane e Júlyla, pelo incondicional apoio em todas as decisões. A vocês, dedico o cumprimento de mais essa etapa, com todo meu amor.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Sagrada Família por me darem sonhos e a capacidade de realizá-los.

A meus pais, por acreditarem nos meus sonhos, fazendo o possível para torná-los realidade. A minhas irmãs, por dividirem comigo momentos únicos, aceitando e acreditando em mim. A vocês, amores da minha vida, meus eternos agradecimentos e todo meu amor.

A meu namorado, Nino, pela paciência, amizade e por permanecer ao meu lado, quando mais fácil seria desistir devido às diferenças.

Agradeço a minha família, avós, tios e primos, por todo apoio dado a meus pais, irmãs e a mim todos esses anos; pelo incentivo e ajuda na realização dos meus sonhos sempre acompanhada de uma união confortante.

Aos amigos que fiz ao longo da minha existência, pela torcida, amizade e compreensão sem as quais não saberia viver, saibam o quanto são especiais em minha vida. Obrigada por todo incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Emiliano Barreto, pela competência com que exerce seu trabalho, pela compreensão, paciência e respeito que teve comigo ao longo desses anos, por me oferecer oportunidades e pelo referencial de profissional que representas em minha vida. Obrigada por ser mais que um professor, por ser amigo e às vezes até meio pai. Obrigada pelo presente de ter um pouco dos meus sonhos realizados e por me motivar a sonhar e buscar a realização da melhor maneira possível.

A família do Laboratório de Biologia Celular, desde aqueles que estiveram juntos desde o início dessa caminhada, Betijane Barros, Isabela Agra, Alex Farias, Renato Rodarte, pela colaboração, ensinamentos e amizade; a minha chefinha Juliane Pereira, por todo carinho, paciência e ensinamentos que muito me ajudam até hoje. Aqueles que foram somando no decorrer do trabalho, Salete Smaniotto, Silvana Ayres, Laís, Fábria, Almair, Rafael, Noé, Anderson Albuquerque, Fabíola Brito, Paulo

Sérgio, Altair, Larissa, Rebeqa e toda a família do LBC. A vocês, meus sinceros agradecimentos pela ajuda, pelos bons dias de trabalho, pela contribuição no enriquecimento do nosso trabalho e por constituírem uma família à parte dentro da Universidade. E aos que estão somando ao final dessa trajetória, por sua compreensão e ajuda.

Aos amigos que fiz durante todos esses anos na UFAL, em especial Edla, Francisca, Lilian, Kyrlla, Douglas, Vanderson, Cíntia, Julianna, Johnathan, com quem pude dividir muitas incertezas e dar boas risadas quando o trabalho parecia não terminar.

Aos mestres que compartilharam comigo suas experiências e com os quais pude aprender muito além dos livros, aprendi a importância de fazer bem aquilo a que nos propomos. Em especial, a Círia Barbosa, pessoa e profissional que muito admiro.

Ao Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, na pessoa da Prof<sup>a</sup>. Lúcia M<sup>a</sup>. Conserva e do amigo Anderson Marques, pelos préstimos na realização desse trabalho.

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde/PDTIS/FIOCRUZ pelo uso da subunidade RPT13B-Plataformas de Plataforma de Métodos Analíticos.

A todo corpo docente, aos colegas da turma de 2010 e coordenação do curso de pós-graduação em Ciências da Saúde, pela ajuda e disposição todo esse tempo

As agências financiadoras do projeto, CNPq/Capes e FAPEAL, pelo apoio financeiro que proporcionaram a concretização desse trabalho.

A todos que direta ou indiretamente participaram da realização desse trabalho, o meu muito e sincero Obrigada!

*“Toda ação de Deus é sempre um gesto de amor, mesmo quando não o compreendemos.”*

(Autor desconhecido).

## RESUMO

A espécie *Clusia nemorosa* é bem distribuída pelo território brasileiro e seus extratos são amplamente utilizados pela medicina popular para tratar diferentes doenças. Mesmo sendo comum o consumo dos extratos de *C. nemorosa* (EHC), os registros científicos sobre as propriedades farmacológicas e análises fitoquímicas desta espécie ainda mostram-se escassos. Assim, no presente estudo objetivamos avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hexânico obtido a partir das cascas do caule de *Clusia nemorosa*. Para traçar o perfil antinociceptivo foram utilizados os modelos de contorção abdominal induzido por ácido acético, formalina e o teste de placa quente. Com propósito de avaliar o perfil anti-inflamatório utilizamos o teste de edema de pata induzido por carragenina. Para melhor compreender as ações do EHC, submetemos os animais tratados com o extrato ao teste de rota-rod e a análises toxicológicas *in vivo* e *in vitro*. No ensaio de contorção abdominal foi observada uma redução na resposta nociceptiva induzida por ácido acético, sendo estes efeitos persistentes por até 2 h após tratamento com EHC. Através do teste de rota rod, verificamos que o EHC não induziu alterações na motricidade dos animais. Com propósito de investigar o possível mecanismo de ação deste extrato os animais foram pré-tratados com naloxona (5 mg/kg), ioimbina (1 mg/kg), atropina (5 mg/kg), metoclopramida (1 mg/kg), haloperidol (2 mg/kg) e L-NAME (20 mg/kg). Apenas quando utilizado a metoclopramida, antagonista de receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos, ocorreu inibição do efeito antinociceptivo do EHC, sugerindo que as vias serotoninérgicas possam estar envolvidas nas ações do extrato, pois o haloperidol, um antagonista dopaminérgico não reverteu a antinocicepção do EHC. Em adição, o tratamento com EHC não induziu alterações na resposta nociceptiva dos animais quando avaliados pelo teste da placa quente, descartando possíveis ações no Sistema Nervoso Central. Em seguida, quando os animais tratados com extrato foram submetidos ao teste de formalina, foi observado que apenas a segunda fase deste teste foi inibida, indicando ações inibitórias sobre a dor de origem inflamatória, revertida pelo pré-tratamento com metoclopramida. Quando os animais foram submetidos ao tratamento por 7 dias consecutivos com o EHC não foram observadas alterações no comportamento, na celularidade do sangue e citotoxicidade *in vitro*, o que descartou possíveis efeitos tóxicos nestes testes preliminares. Através de análise de cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa, foi identificado o componente majoritário presente no extrato, a friedelina (1 e 10 mg/kg; i.p.), que apresentou efeitos antinociceptivos na dor de origem neurogênica e inflamatória, evidenciado pelo teste de formalina. Ainda neste modelo, foi observado que a friedelina manteve seus efeitos antinociceptivos na dor de origem inflamatória quando administrado por via oral. Além disso, a friedelina inibiu o edema de pata induzido por carragenina. Em adição, em ensaios *in vitro*, este triterpeno não alterou a viabilidade celular. Em conjunto, nossos resultados sustentam o uso popular desta planta tendo por base seus efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios. Além disso, relatamos pela primeira vez a presença do triterpenóide pentacíclico, friedelina, na casca de *C. nemorosa*, sendo este triterpenóide possivelmente responsável pelos efeitos farmacológicos avaliados.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. *Clusia nemorosa*. Antinocicepção. friedelina.

## ABSTRACT

*Clusia nemorosa* is distributed throughout Brazil and its extract is widely used in popular medicine to treat different diseases. Although the popular use of extract of *C. nemorosa*, the scientific reported on their pharmacological and phytochemical analysis are scarce. In the present study, we aimed to evaluate the antinociceptive and antiinflammatory effect of hexane extract of *Clusia nemorosa*-derived stem bark (EHC). To evaluate the antinociceptive effect of EHC classical models of the study of pain were used, such as the abdominal writhing test induced by acetic acid, formalin test and hot plate test. In order to evaluate anti-inflammatory effect of EHC, the model of paw edema induced by carrageenan were used. Rota-rod testing and toxicological analysis *in vivo* and *in vitro* were performed. Mices submitted to abdominal writhing test, was observed a significant reduction in nociceptive response induced by acetic acid, and these effects persisted for up to 2 h after treatment. Moreover, it is important emphasizing that the EHC did not induce changes in motor function of animals when the rota-rod test was performed. In order to investigate the possible mechanism of action of EHC, the animals were pretreated with naloxone (5 mg/kg), yohimbine (1 mg/kg), atropine (5 mg/kg), metoclopramide (1 mg/kg), haloperidol (2 mg/kg) and L -NAME (20 mg/kg). Only when used metoclopramide, a serotonergic and dopaminergic antagonist receptor, it was observed an inhibition of the antinociceptive effect of EHC, suggesting that the serotonergic pathway may be involved in the action of the EHC, as haloperidol, a dopaminergic antagonist did not reverse the antinociception of EHC. In addition, EHC did not induce changes in the nociceptive response of animals when assessed by the hot plate test, discarding the action in the central nervous system. Then, when the animals were treated with EHC and submitted to the formalin test, it was observed that only the second phase of this test was inhibited by the EHC, indicating inhibitory actions on pain of EHC from inflammatory origin. To evaluate possible toxic effects of EHC, animals were treated for 7 consecutive days. Then after treatment, were not observed changes in behavior, blood cellularity and cytotoxicity *in vitro*, which ruled out possible of toxic effects in these preliminary tests. Through analysis of gas chromatography coupled with mass spectrum, the major component present in the extract was identified, friedelin, who presented antinociceptive effects on pain and inflammation of neurogenic origin, as evidenced by the formalin test. Although this model of pain induced by formalin, it was observed that the antinociceptive effects friedelin were maintained when the EHC was administered orally. In addition, friedelin inhibited the paw edema induced by carrageenan. Lastly, *in vitro* assays, this triterpene did not affect cell viability as measured by MTT test. Together, our results support the popular use of this plant based on their anti-inflammatory and antinociceptive effects. In addition, we report the first time the presence of pentacyclic triterpenoid, friedelin on hexane extract of *Clusia nemorosa*-derived stem bark, triterpenoid which is possibly responsible for the pharmacological effects evaluated.

**Keywords:** Medicinal plants. *Clusia nemorosa*. Antinociception. friedelin.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Evolução da Inflamação aguda.....	20
FIGURA 2: Fibras nociceptivas: Fibras A $\delta$ , mielinizadas e fibras C, não mielinizada.....	23
FIGURA 3: Mecanismos centrais da dor.....	24
FIGURA 4: Nociceptores periféricos e mediadores inflamatórios liberados após lesão.....	25
FIGURA 5: <i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae).....	29
FIGURA 6: <i>Catharanthus roseus</i> (Apocynaceae).....	30
FIGURA 7: <i>Cordia verbanacea</i> DC. (Boraginaceae).....	31
FIGURA 8: <i>Clusia nemorosa</i> Mey. (Clusiaceae).....	33
FIGURA 9: Representação da metodologia de contorção abdominal em camundongos induzida por ácido acético (0,8%).....	36
FIGURA 10: Avaliação do mecanismo de ação do EHC através do bloqueio de antagonistas de receptores envolvidos na transmissão do processo doloroso.....	37
FIGURA 11: Período de avaliação do EHC no ensaio de toxicidade aguda.....	39
FIGURA 12: Avaliação da celularidade do sangue periférico dos animais tratados com EHC.....	40
FIGURA 13: Avaliação da atividade antinociceptiva do EHC.....	43
FIGURA 14: Avaliação da duração do efeito antinociceptivo do EHC.....	44
FIGURA 15: Avaliação da capacidade motora dos animais tratados com EHC.....	45
FIGURA 16: Avaliação da atividade antinociceptiva do EHC induzida por formalina.....	48
FIGURA 17: Avaliação do envolvimento do receptor serotoninérgico na atividade antinociceptiva do EHC induzida por formalina.....	49
FIGURA 18: Avaliação da atividade anti-edematogénica do EHC.....	50
FIGURA 19: Efeito do EHC sobre a viabilidade celular avaliado pelo teste de MTT.....	52
FIGURA 20: Cromatograma obtido por CG-MS da análise do EHC.....	53
FIGURA 21: Efeito da friedelina sobre a viabilidade celular.....	54
FIGURA 22: Avaliação da atividade antinociceptiva da Friedelina no modelo de formalina.....	54

FIGURA 23: Avaliação da atividade antiinflamatória da Friedelina no modelo de edema de pata por carragenina.....	55
FIGURA 24: Avaliação da atividade antinociceptiva da Friedelina no modelo de formalina tratado por via oral.....	56

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Nomes populares atribuídos a espécie <i>Clusia nemorosa</i> Mey.....	32
TABELA 2: Investigação dos receptores de ação envolvidos no mecanismo de ação do EHC.....	46
TABELA 3: Tempo de latência do EHC quando submetido ao estímulo térmico....	47
TABELA 4: Contagem de leucócitos totais e diferenciais de sangue periférico após tratamento com o extrato de <i>C. nemorosa</i> .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina  
AINES- Anti-inflamatório não esteroidais  
ANOVA- Análise de Variância  
AMPc – Monofosfato cíclico de adenosina  
CG-MS - Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massa  
COX-2 – Ciclooxygenase 2  
DCPO – Dor crônica pós-operatória  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
EHC – Extrato hexânico de *Clusia nemorosa*  
GMPc - Monofosfato cíclico de guanidina  
IASP – Associação Internacional para Estudos da Dor  
Il-1 $\beta$  - Interleucina 1 $\beta$   
i.p. – Intraperitoneal  
i.pl. Intraplantar  
L-NAME - N(G)-nitro-L-arginine methyl ester  
LTB4 – Leucotrieno B4  
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio  
NA - Noradrenalina  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NO – Óxido Nítrico  
PAF – Fator de ativação plaquetaria  
PGD2 – Prostaglandina D2  
PGE2 – Prostaglandina E2  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNP – Sistema Nervoso Periférico  
v.o. – Via oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Considerações gerais sobre o processo inflamatório.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Considerações gerais e mecanismos envolvidos no processo doloroso.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3</b>	<b>Plantas medicinais.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Família Clusiaceae e espécie <i>Clusia nemorosa</i> Mey.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Obtenção do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> Mey.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Tratamento.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4</b>	<b>Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato de <i>Clusia nemorosa</i>....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Nocicepção induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético.....</b>	<b>35</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Efeito temporal da ação antinociceptiva do extrato de <i>Clusia nemorosa</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Avaliação do mecanismo de ação do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> no modelo de contorção abdominal por ácido acético.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Nocicepção induzida por estímulo térmico.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4.5</b>	<b>Nocicepção induzida por formalina.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato de <i>Clusia nemorosa</i>....</b>	<b>38</b>
<b>4.6</b>	<b>Avaliação de efeitos toxicológicos sistêmicos do extrato de <i>Clusia nemorosa</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.1</b>	<b>Avaliação dos efeitos de toxicidade sistêmica em camundongos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Avaliação dos leucócitos do sangue periférico dos camundongos tratados com extrato de <i>Clusia nemorosa</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Avaliação da motricidade do modelo de Rota Rod.....</b>	<b>40</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>Clusia nemorosa</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.7</b>	<b>Identificação dos constituintes químicos do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massa (CG-MS)</b>	<b>41</b>

4.8	Análise estatística.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> sobre a nocicepção induzida por ácido acético.....	43
5.2	Cinética do efeito antinociceptivo do extrato hexânico de <i>C. nemorosa</i> ...	44
5.3	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> a motricidade dos animais.....	45
5.4	Investigação do mecanismo de ação do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> .....	45
5.5	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> sob a nocicepção induzida por estímulo térmico.....	46
5.6	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> sobre a nocicepção induzida por formalina.....	47
5.7	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> no modelo de edema de pata induzida por carragenina.....	49
5.8	Efeito extrato de <i>Clusia nemorosa</i> sob a celularidade sanguínea.....	50
5.9	Efeito do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> sob a viabilidade celular <i>in vitro</i> .....	51
5.10	Identificação dos constituintes químicos do extrato de <i>Clusia nemorosa</i> por CG-MS.....	52
5.11	Efeito da friedelina sob a viabilidade celular <i>in vitro</i> .....	53
5.12	Efeito antinociceptivo da friedelina no modelo de formalina.....	53
5.13	Efeito antiinflamatório da Friedelina no modelo de edema de pata por carragenina.....	54
5.14	Efeito do tratamento via oral da friedelina na nocicepção induzida por formalina.....	55
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta complexa dos tecidos vascularizados a uma determinada agressão com objetivo de confinar a lesão a uma área limitada, eliminar estímulos nocivos e restaurar a homeostase. Assim, após a agressão o tecido sofre mudanças locais que incluem: alterações na microcirculação, aumento da permeabilidade vascular e chegada de leucócitos do sangue para o local da lesão. Como consequência destas alterações o tecido passa a apresentar os sinais típicos do processo inflamatório, denominados de sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, edema, dor e perda funcional (COTRAN et al., 2000; HENSON, 2005).

Como um sinal importante da inflamação, a dor está presente em diversas patologias servindo como sinal de alerta ao organismo indicando a ocorrência de possíveis agressões. Devido a sua importância, a dor é considerada o quinto sinal vital humano, juntamente com a temperatura corpórea, pressão arterial, ritmo cardíaco e frequência respiratória (SBED, 2005).

Atualmente, a dor é apontada como um dos principais motivos que levam a incapacidade do indivíduo de desenvolver suas atividades diárias, chegando até mesmo ao afastamento definitivo do mercado de trabalho, o que gera alto custo para a sociedade moderna (SBED, 2009). Assim, quando a dor deixa de ser um sinal de alerta para o organismo e torna-se recorrente e/ou intermitente, esta sensação pode acarretar elevados custos pessoais e profissionais ao indivíduo. Mesmo na atualidade havendo um vasto arsenal terapêutico para o tratamento da dor, em algumas doenças como lesões neuropáticas e câncer, as opções disponíveis não são satisfatórias por não apresentarem a supressão da dor e nem do processo que a originou (SBED, 2009).

Merece destacar também que os fármacos utilizados para o tratamento da dor e inflamação apresentam efeitos colaterais decorrente do seu uso, como os danos ao trato gastrointestinal promovido pelos anti-inflamatórios não esteroidais (GUSTEIN e AKILL, 2003). Assim, tendo por base este contexto, nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisas buscam alternativas para eliminar e/ou amenizar a dor e o processo inflamatório decorrentes das mais diversas etiologias. Dentre estas alternativas, o uso de plantas medicinais e de fitoterápicos merece destaque não somente pela aceitabilidade cultural, como também pelos estudos científicos da eficácia e segurança de algumas espécies, sendo apontadas como

fontes complementares no fornecimento de princípios ativos para o atual arsenal terapêutico (RATES, 2001).

Dentro da imensa diversidade de espécies vegetais, merece destaque a família Clusiaceae (Guttiferae) onde diversas plantas vêm sendo utilizadas com fins terapêuticos, incluindo ações como eméticas, catárticas, diuréticas e adstringentes (ANDRADE, 1997). No gênero *Clusia*, algumas espécies são popularmente empregadas no tratamento de hanseníase, cefaléias, cicatrização de feridas e hipertensão (ANDRADE, 1998).

Dentre as diversas espécies do gênero *Clusia*, destacamos a espécie *Clusia nemorosa* G. Mey. Desta espécie, há relatos sobre o emprego popular de suas folhas para o tratamento de processos inflamatórios, dolorosos e cicatrizantes (ANDRADE, 1997; VOLKER, 2007), porém, os relatos científicos que comprovem sua eficácia para estes fins são escassos. Portanto, utilizando diferentes modelos animais para o estudo da dor e inflamação, objetivamos neste trabalho avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hexânico obtido a partir das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey.

## 2 OBJETIVOS

### 2. 1 Objetivo geral:

Avaliar os possíveis efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hexânico obtido a partir das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey utilizando diferentes modelos experimentais em camundongos.

### 2. 2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade antinociceptiva do extrato hexânico obtido das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey utilizando os modelos de contorção abdominal, placa quente e formalina em camundongos.
- Verificar o tempo de duração da atividade antinociceptiva do extrato estudado.
- Verificar o mecanismo de ação envolvido na atividade antinociceptiva do extrato estudado utilizando o modelo de contorção abdominal.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hexânico obtido das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina.
- Realizar uma avaliação preliminar dos possíveis efeitos tóxicos *in vivo* e *in vitro* do extrato hexânico obtido das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey em camundongos.
- Identificar o constituinte químico majoritário presente no extrato hexânico obtido das cascas do caule de *Clusia nemorosa* G. Mey.
- Avaliar os efeitos antinociceptivo e antiedematogênicos da friedelina

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

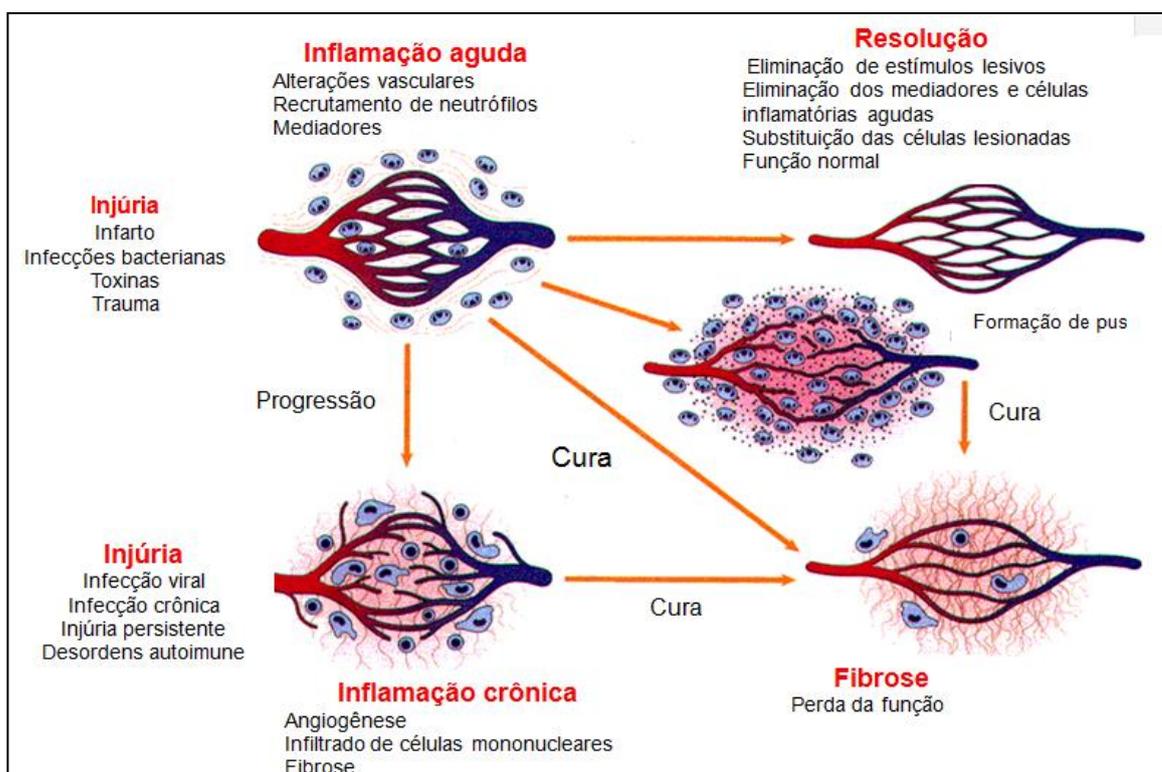
#### 3.1 Considerações gerais sobre o processo inflamatório

A inflamação é formada por processos complexos que se associam e se complementam com objetivo final de combater o agente agressor e eliminar produtos resultantes da destruição celular ocorrida após o estabelecimento da inflamação, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Dessa forma, esse processo pode ser definido como um conjunto de alterações celulares e bioquímicas que ocorrem em resposta a estímulos de diversas etiologias com propósito de restringir a área afetada, eliminar o agente agressor e promover o reparo tecidual (HENSON, 2005).

A inflamação é um sinal frequente em pacientes com enfermidades crônicas, incluído alergia, câncer, artrite reumatóide e doenças cardiovasculares (HENSON, 2005). Vale mencionar que pacientes acometidos por estas patologias exibem uma exacerbação do quadro clínico quando há uma falta de controle sobre a resposta inflamatória o que resulta no agravamento da doença (TORIGOE; LAURINDO, 2006).

A resposta inflamatória pode ser desencadeada por diversos estímulos, incluindo agentes químicos, biológicos e físicos (HELLER et al., 1998). Porém independente do estímulo, a inflamação pode ser classificada de uma maneira geral quanto ao tempo de duração, sendo descrito como inflamação aguda ou crônica. A resposta inflamatória aguda inicia imediatamente após a agressão, podendo durar de poucas horas até alguns dias. Nesta fase aguda, a inflamação mostra-se marcada pela vasodilatação de arteríolas e vênulas, extravasamento de plasma e migração dos leucócitos para o local agredido, sendo os neutrófilos as células mais abundantes. Já a resposta inflamatória crônica, pode durar dias, meses ou mesmo anos, e envolve, principalmente, a migração dos demais leucócitos (mononucleares, linfócitos, plasmócitos) e fibroblastos (GILROY, 2004; HENSON, 2005) (FIGURA 1).

**FIGURA 1-** Evolução da inflamação aguda.



Fonte: Robbins e Cotran. Patologia Básica das doenças - Kumar, Abbas e Fausto. 7ª Edição.

Os mediadores químicos que atuam nos eventos iniciais da resposta inflamatória são liberados por células residentes após a agressão local, e incluem as aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina e a Substância P. Após a instalação do processo inflamatório, ocorre uma segunda onda de liberação de mediadores, envolvendo a participação de mediadores lipídicos como prostaglandina E2 (PGE2), fator de ativação plaquetária (PAF) e leucotrienos (HELLER et al., 1998; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Estes mediadores atuam sobre a vasculatura tecidual promovendo a vasodilatação das arteríolas e alteração no fluxo sanguíneo, o que proporciona o aparecimento de hiperemia e aumento da permeabilidade vascular, responsável pela formação do edema (GILROY, 2004).

Na sequência de eventos que levam ao estabelecimento do processo inflamatório, outra alteração típica que ocorre envolve uma intensa migração transendotelial de leucócitos do interior do vaso sanguíneo para o tecido inflamatório (EDENS e PARKOS, 2003). Este processo de migração celular para o local agredido mostra-se de fundamental importância para o controle e resolução da inflamação, devido às ações fagocíticas dos leucócitos.

No sítio da agressão, os leucócitos, como os polimorfonucleares, secretam várias substâncias, dentre elas uma proteína catiônica, chamada de azurocidina, que atua como agente quimiotático e ativador de monócitos e macrófagos. Além disso, a azurocidina ativa a retração endotelial o que contribui para o extravasamento plasmático e formação de edema. Os leucócitos e seus grânulos estão relacionados tanto a destruição do agente agressor, como aos danos teciduais causados ao organismo resultante da inflamação fora de controle (SOEHNEIN; LINDBOM, 2009). Outros mediadores químicos são importantes para o recrutamento de diferentes tipos celulares para o foco inflamatório, merecendo destaque os mediadores lipídicos como as prostaglandinas, leucotrienos, além das citocinas e quimiocinas (VERRI et al., 2006; ASHMAWI et al., 2009; HARVIMA e NILSSON, 2011).

As enzimas cicloxigenase e lipoxigenase, responsáveis pela produção de PGE2 e leucotrieno B4 (LTB4), respectivamente, mostram-se como alvos para a produção de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos, o que revela o grande envolvimento desta via para a orquestração da resposta inflamatória (BERTOLINI; ATTONI; SANDRINI, 2002). Além desta, outra via importante para a dor e inflamação envolve a sinalização de citocinas e quimiocinas. Estes mediadores destacam-se pela capacidade de perpetuar a resposta inflamatória por ativar e quimioatrair leucócitos para o local agredido. Além do envolvimento destes mediadores na manutenção da inflamação, diferentes relatos descrevem o envolvimento de citocinas como atenuadores da inflamação, em especial atuando na resolução do processo visando a homeostase do tecido (VERRI et al., 2006; MOSER et al., 2004; CHARO e RANSOHOFF, 2006).

### 3.2 Considerações gerais e mecanismos envolvidos no processo doloroso

A dor resulta da interação de diversas áreas do cérebro responsáveis pela codificação da dor, classificação da sua intensidade, duração, qualidade e associações emocionais. Trata-se de uma resposta fisiológica associada a lesões teciduais reais ou potenciais que resultam na ativação de sistemas sensoriais e não sensoriais que resultam no que se conhece como sensação dolorosa (WOOLF, 2010).

No Brasil, mesmo havendo uma escassez de estudos que revelem a situação de exposição da população à dor, a Sociedade Brasileira para Estudos da Dor (SBED) estima que o número de brasileiros acometidos por dores crônicas possa chegar à ordem de 50 milhões (SBED, 2009). Uma informação que merece destaque refere-se às estimativas de que cerca de 70% das pessoas buscam atendimento médico por estarem acometidas por dores de diferentes naturezas (ROCHA et al., 2007). Dentre estes pacientes incluem-se os indivíduos que relatam a dor crônica pós-operatória (DCPO), dor que persiste por mais de três meses após o procedimento cirúrgico. Pesquisas feitas nos Estados Unidos, referem que cerca de 1,8% a 6,7% dos pacientes submetidos a cirurgias apresentaram DCPO. Já na Inglaterra esse número variou de 0,5% a 14%. No Brasil, ainda não se tem dados relativos a essa problemática (LEÃO; KRAYCHETE, 2011).

Dados epidemiológicos revelam que nos Estados Unidos cerca de 31% (86 milhões de pessoas) da população apresenta dor crônica, sendo que em 75% desses (65 milhões de pessoas) ocorre incapacidade parcial ou total de realizar diferentes tipos de atividades cotidianas (SBED, 2005 *apud* PANCHAL, 2000). Em países industrializados a dor lombar é a queixa mais frequente, estando presente em 70% das pessoas que apresentam limitação das atividades nos Estados Unidos (SILVA; FASSA; VALLE, 2004).

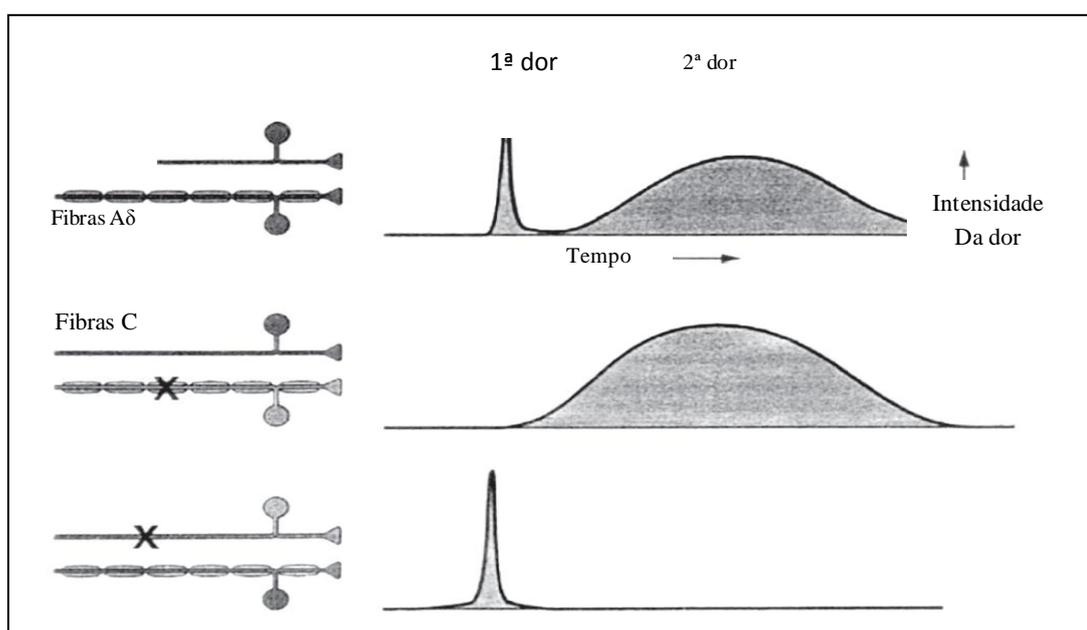
A classificação da dor ainda é bastante discutida, mas de uma maneira geral pode ser classificada de acordo com o tempo de duração (aguda e crônica) e de acordo com o tipo de lesão e mediadores associados (neuropática, neurogênica, nociceptiva, psicogênica, alodinia e hiperalgesia) (BESSON, 1999). Vários são os mecanismos que conduzem ao estímulo doloroso, sendo necessário o entendimento da neuroanatomia, neurofisiologia e fisiopatologia da dor para facilitar os estudos a cerca de novas alternativas para seu tratamento (ROCHA et al., 2007).

A dor aguda é provocada por uma lesão real, decorrente da ativação dos nociceptores, tem curta duração, estendendo-se de horas a poucos dias, cessando após a eliminação do estímulo que a originou. Já a dor crônica ocorre após a ativação dos nociceptores e persiste mesmo na ausência do processo que a originou ter sido eliminado, sendo esta sensação mantida por fatores distintos daqueles que originaram o processo agudo (LOESER e MELZACK, 1999).

Dependendo do tipo de lesão, a dor pode ser classificada como: nociceptiva, onde ocorre uma estimulação dos nociceptores; neuropática, onde há disfunção do nervo; neurogênica, situação em que o nervo é lesionado; psicogênica, onde os fatores psicológicos predominam sobre os fisiológicos; hiperalgesia, em que ocorre sensibilidade excessiva a estímulos dolorosos e alodinia, quando o indivíduo percebe como sensação dolorosa estímulos não nociceptivos (BESSON, 1999; OLIVEIRA, 2003).

O estímulo nocivo é percebido pelos nociceptores presentes nas fibras nervosas A $\delta$  e C e daí são enviadas ao sistema nervoso central (SNC) (ROCHA et al., 2007). As fibras A $\delta$ , mielinizadas, são responsáveis por responder a estímulos térmicos e mecânicos e conduzem o sinal de forma rápida a uma velocidade de 3 a 30 m/s. Já as fibras C, não mielinizadas, respondem ao calor e com condução de onda lenta da informação, aproximadamente 3 m/s, sendo mais correlacionada a processos dolorosos prolongados e incômodos (LEMKE, 2004) (FIGURA 2).

**FIGURA 2** - Fibras nociceptivas.



Fibras A $\delta$ , mielinizadas e fibras C, não mielinizadas (Fonte: LEMKE, 2004).

Essas fibras ficam localizadas na cadeia formada por três tipos gerais de neurônios, denominados de neurônios de primeira, segunda e terceira ordem. Os primeiros, neurônios aferentes primários, são responsáveis pela transdução da informação nociceptiva e condução de sinais periféricos dos tecidos aos neurônios no corno dorsal da medula. Os neurônios de segunda ordem conduzem a informação enviada pelos neurônios de primeira ordem a diferentes regiões do SNC como bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo. Já os neurônios de terceira ordem integram os sinais recebidos dos neurônios espinhais projetando-os para as áreas subcortical e cortical, encerrando o percurso dos componentes da via ascendente de nocicepção do estímulo doloroso (LEMKE, 2004). Assim, a transmissão do processo doloroso envolve vários eventos celulares e bioquímicos, incluindo sensibilização de receptores, liberação de mediadores, extravasamento de fluidos, ativação de enzimas, migração de células e dano tecidual (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998). Dessa maneira, a agressão ao organismo desencadeia etapas do processo doloroso que ocorrem de maneira integrada, sendo elas: transdução, transmissão, modulação e percepção (VANEGAS e SCHAIBLE, 2001; AZEVEDO et al., 2003) (FIGURA 3).

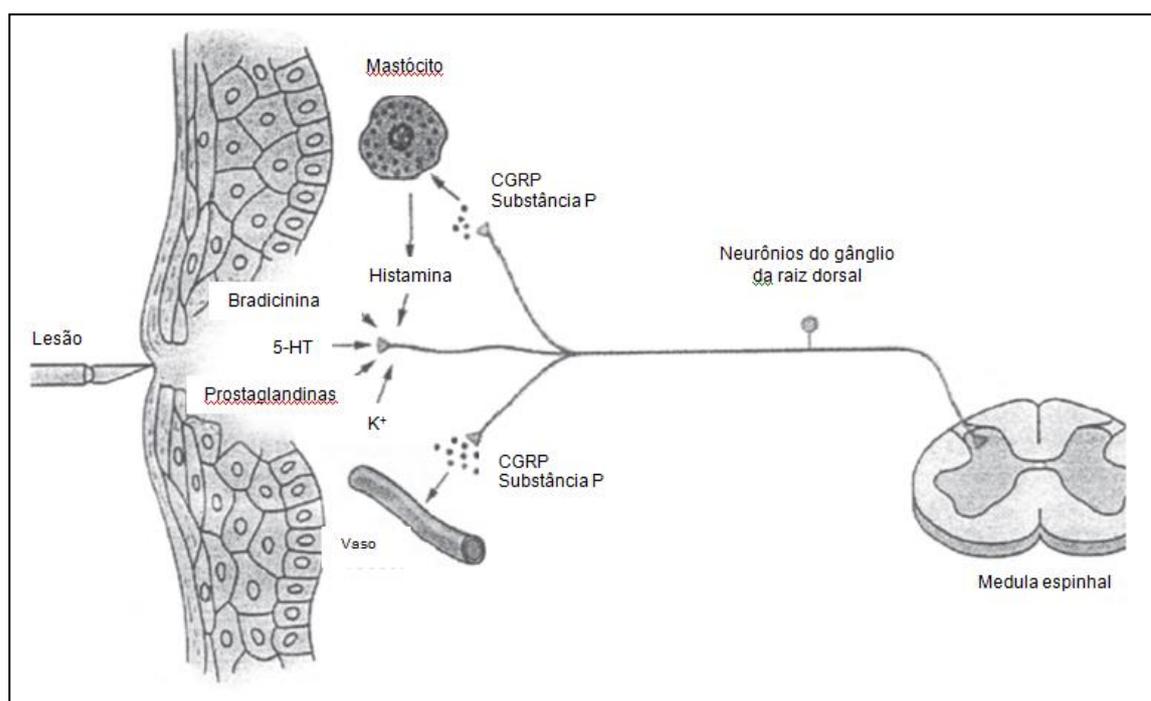
FIGURA 3 - Mecanismos centrais da dor.



(Fonte: <http://www.dol.inf.br/Html/CompreendendoDor.htm>).

A etapa de transdução mostra-se como a codificação do estímulo nocivo para sinais elétricos pelos nociceptores. Nesta etapa, com a ativação dos nociceptores ocorre liberação de mediadores químicos (histamina, prostaglandina E2 (PGE2), bradicinina, sódio, potássio, cálcio, Substância P, opióides e noradrenalina) que irão desencadear alterações vasculares e sensibilização dos nociceptores (LEMKE, 2004) (FIGURA 4).

**FIGURA 4** - Nociceptores periféricos e mediadores inflamatórios liberados após lesão.



A ativação dos terminais nociceptivos provoca liberação de Substância P e CGRP. A liberação destes neuropeptídeos causa degranulação de mastócitos, vasodilatação e edema, e ativação e sensibilização de nociceptores. 5-HT=serotonina; CGRP= peptídeo relacionado ao gene da calcitonina. (Fonte: Adaptado de LEMKE, 2004).

A via do sistema de percepção e inibição da dor tem início a nível supra-espinal e se projeta dos neurônios do corno dorsal da medula espinhal. A via descendente é composta pelo mesencéfalo (substância cinzenta periaquedutal), ponte (*locus ceruleus*) e medula (núcleo magno da rafe). A substância cinzenta é que recebe a informação do tálamo, hipotálamo e córtex cerebral e envia as informações ao corno dorsal. O *locus ceruleus* projeta a informação diretamente aos neurônios do corno dorsal da medula (LEMKE, 2004).

As vias de sinalização celular utilizadas pelos diferentes mediadores químicos envolvidos nos eventos de percepção do processo doloroso dependem de

receptores acoplados a proteína G, a enzima tirosinaquinase e canais iônicos dependente de voltagem, dentre outros. Esses receptores ativam os segundos mensageiros, monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) ou monofosfato cíclico de guanidina (GMPc), que mantém a ativação do processo resultando na ampliação do sinal (AZEVEDO et al., 2003). Quando o estímulo nocivo que originou esse processo cessa, estes mecanismos são desativados. No entanto, se ocorrer uma ativação permanente, outros mecanismos serão mobilizados sendo responsáveis pela manutenção do quadro de dor crônica (PETRENKO, 2003). Para que ocorra a modulação e percepção do estímulo nocivo como doloroso, deve ocorrer a transmissão nociceptiva periférica para os neurônios espinotalâmicos, controlada por mecanismos inibitórios mediados por neurônios da substância cinzenta e ativados pelo sistema descendente inibitório, que se inicia no tronco cerebral, de natureza opióide (encefalinas) e não-opiíides (serotonina (5-HT), noradrenalina /  $\alpha_2$ ) (FIELDS; HEINRICHER; MASON, 1991; DICKENSON, 1997; FURST, 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2001; Ji et al., 2003).

Vale destacar que diferentes mediadores endógenos são capazes de interferir nos mecanismos de transmissão da dor. Dentre esses mediadores, as prostaglandinas e leucotrienos mostram-se importantes por serem capazes de sensibilizar nociceptores, sendo a inibição da produção/ação destes mediadores uma das bases propostas como mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (BESSON, 1999).

Há uma grande diversidade de receptores envolvidos na transmissão da sensação dolorosa, dentre eles, os receptores opiíides. Estes receptores, que também são encontrados no SNC, em casos de inflamação passam a ser expressos em maior quantidade no sistema nervoso periférico (McQUAY, 1999). Além destes, tem sido relatado o envolvimento dos receptores serotoninérgicos (5-HT e subtipos 1, 2 e 3) na transmissão da dor (MILLAN, 2002; COLPAERT, 2002; FAEBER et al., 2007) e que estes receptores encontram-se no cérebro, projetam-se do Núcleo Magno da Rafe para a substância cinzenta periaquedutal e tálamo, estando envolvidos no mecanismo antinociceptivo (BESSON e CHAOUCH, 1987; BOWKER, 1982). Também tem sido descrita a relação dos receptores dopaminérgicos com a transmissão da dor, inclusive dor inflamatória (ZARRINDAST; NASSIRI-RAD; PAZOUKI, 1999). Dessa forma, com a complexidade do sistema de transmissão dolorosa, a diversidade de receptores e sua variada distribuição pelo organismo,

pode ser definida como uma das razões dos efeitos colaterais observados nas classes terapêuticas disponíveis, como exemplo a morfina, onde seus efeitos terapêuticos e colaterais deve-se em parte a superposição de ação dos receptores opióides  $\mu$  e  $\kappa$  (BESSON, 1999; GUSTEIN e KAIL, 2003).

### 3.3 Plantas medicinais

O homem, desde o início das civilizações, faz uso dos recursos naturais em seu cotidiano, onde utiliza produtos extraídos de plantas e animais para sanar as enfermidades (RATES, 2001). Em decorrência dessas ações e através da observação, logo se percebeu que havia substâncias com ação medicinal e/ou tóxica (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, o termo plantas medicinais é definido como “espécies vegetais a partir das quais produtos de interesse terapêutico podem ser obtidos e usados na espécie humana como medicamento”. Dessa maneira, estudos com propósito de comprovar a eficácia e segurança desses produtos para que seus benefícios sejam úteis às sociedades mostram-se necessários (Ministério da Saúde, 2006).

Tendo em vista a grande importância do uso de plantas com propriedades medicinais pela população, o Ministério da Saúde regulamentou o uso de plantas medicinais pelo decreto federal 5.813 de 22 de junho de 2006 por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (Ministério da Saúde, 2006). Em continuidade a esta política, em 2009, o Ministério da Saúde, divulgou a 1ª edição do livro denominado Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (Ministério da Saúde, 2009). Estas ações garantem a difusão ordenada do conhecimento sobre plantas medicinais pela sociedade. Além disso, impulsionam o desenvolvimento científico e tecnológico por garantir fomento a pesquisa, e ao desenvolvimento a inovação com base na biodiversidade brasileira e de acordo com as necessidades epidemiológicas da população (Ministério da Saúde, 2009).

No ano de 2010, ainda com o objetivo de orientar pesquisas e ampliar a lista de medicamentos fitoterápicos disponíveis na assistência farmacêutica básica em todo o país, o Ministério da Saúde divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Esta lista mostra-se composta por 71 espécies de plantas com interesse medicinal, onde há estudos capazes de endossar seus efeitos farmacológicos e terapêuticos (Ministério da Saúde, 2010).

As propriedades terapêuticas das plantas não se limitam as espécies relacionadas no RENISUS, visto que apesar de toda biodiversidade existente, apenas 17% foi estudada sob aspectos fitoquímicos ou farmacológicos (FOGLIO, 2006 *apud* HOSTERTTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003). Desse montante, a maior concentração de espécies vegetais ocorre na América do Sul, sendo o Brasil, o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, com cerca de 55.000 espécies catalogadas (SIMÕES et al., 2007 *apud* DIAS, 1996).

Antenados a essa realidade diferentes estudos vem sendo conduzidos com objetivo de envolver o uso popular de produtos naturais para orientar a busca de novos fármacos (YUNES e CALIXTO, 2001). Assim, para validação científica de uma planta medicinal, algumas etapas devem ser seguidas, incluindo estudos botânicos, identificação química, testes farmacológicos pré-clínicos e clínicos e trabalhos nas comunidades para indicar a forma de uso correta da planta medicinal (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

No início da era Cristã, Dioscórides (40-90 d.C.), autor de “De Matéria Médica”, foi um dos primeiros a relatar o uso do ópio como veneno pelo Imperador Nero para aniquilar seus inimigos. No entanto, foi apenas em 1806 que ocorreu o isolamento e caracterização química da morfina isolada de várias espécies do gênero *Papaver sp.*, incluindo a espécie *Papaver somniferum* (Papaveraceae) (FIGURA 5). Devido a sua importância médica, a morfina, princípio ativo do ópio, é usada até os dias de hoje na prática clínica (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

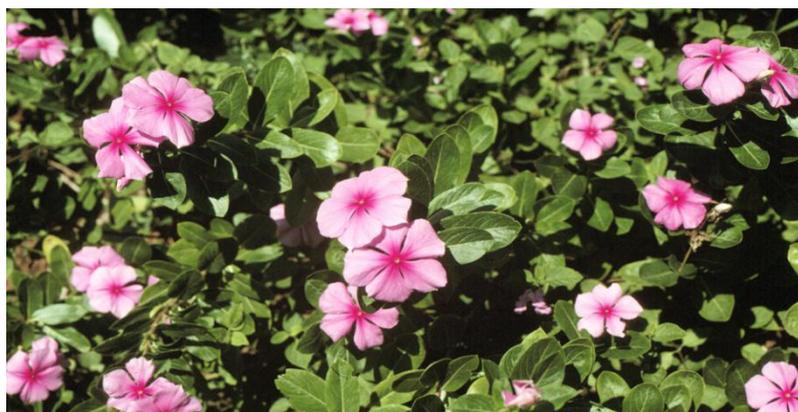
**FIGURA 5** - *Papaver somniferum* (Papaveraceae).



(Fonte: <http://commons.wikimedia.org/>).

Diversos outros exemplos de produtos de origem natural que fornecem substâncias com importância clínica merecem ser destacados. Dentre estas substâncias a salicilina, protótipo do anti-inflamatório não esteroideal ácido acetilsalicílico, um glicosídeo natural proveniente da *Salix Alba* (Salicilaceae) conhecida popularmente como salgueiro (BARREIRO e FRAGA, 2001 *apud* HACKSELL, 1996). Além deste, o alcalóide taxol, isolado do gênero *Taxus* sp. (Taxaceae), utilizado na medicina como agente quimioterápico no tratamento de cânceres de mama, pulmão e garganta (CORREA, 1995). Outras moléculas com propriedades anticancerígena são a vincristina e vimblastina, dois alcalóides que foram obtidos a partir da *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) (FIGURA 6) (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006 *apud* HACKESSEL, 1996), e o lapachol e  $\beta$ -lapachona, isoladas das cascas da espécie *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) (Bignoniaceae) uma espécie nativa do Brasil (MELO et al., 2011).

**FIGURA 6** - *Catharanthus roseus* (Apocynaceae).



(Fonte: <http://www.nybg.org>).

Estudos com espécies do gênero *Piper sp.*, apresentam-se como promissoras fontes de metabólitos com potencial medicinal, como a *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianun* (Piperaceae), que possui potencial antinociceptivo, assim como as substâncias isoladas dessa espécie, Conocarpan e Orientina (Da SILVA et al., 2010). Estudos realizados no Brasil com extratos obtidos do óleo essencial de *Cordia verbanacea* DC. (Boraginaceae) (FIGURA 7), indicaram que a planta é possuidora de propriedades anti-inflamatórias e anti-alérgicas, sendo o sesquiterpeno  $\alpha$ -humuleno, o responsável pela atividade anti-inflamatória detectada (PASSOS et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007). A partir desses estudos prévios, em parceria com o laboratório farmacêutico Aché, foi desenvolvido o medicamento Acheflan®, cujo princípio ativo é o  $\alpha$ -humuleno, utilizado no tratamento de processos inflamatórios, como tendinites e dores musculares, com diversas apresentações, sendo o primeiro medicamento desenvolvido no Brasil.

Dentre os estudos mais recentes de espécies com potencial terapêutico, destaca-se a espécie *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae), conhecida popularmente como sucupira preta, onde estudos comprovaram seu potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo (BARROS et al., 2010; SILVA et al., 2010; THOMAZZI et al., 2010).

FIGURA 7 - *Cordia verbanacea* DC. (Boraginaceae).



Fonte: <http://plantamedica.com.br>.

### 3.2.1 Família Clusiaceae e a espécie *Clusia nemorosa* G. Mey

Constitui uma família de cerca de 1500 espécies que inclui arbustos e árvores, encontradas predominantemente nos trópicos. Esta família possui seis subfamílias, a saber: Kiemeyeroideae, Calophyllideae, Clusioideae, Moronoboideae, Lorostemmonoideae e Heperiocoideae (ANDRADE, 1997). As diferentes espécies são encontradas em todo território brasileiro, além de países da América do Sul e Central (VOLKER, 2007). Os gêneros mais estudados são *Rheedia* sp., *Kiellmeyera* sp., *Tovomita* sp. e *Hypericum* sp. (CECHINEL FILHO, 2000; PINHEIRO et al., 2003; UNCHIDA et al., 2008; SUFFREDINI et al., 2006).

Espécies do gênero *Hypericum* são usadas na medicina tradicional como cicatrizantes e ansiolíticas. Além disso, estudos científicos vêm demonstrando que espécies deste gênero também se mostram capazes de apresentar um potencial antinociceptivo e antidepressivo (UNCHIDA et al., 2008). Outro exemplo que merece destaque é a *Rheedia gardenirana*, nesta espécie detectou-se importante atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (CECHINEL FILHO, 2000). Suffredini e colaboradores (2006) em estudo com diversas espécies da família Clusiaceae observaram importante atividade antibacteriana nas espécies de *Haploclathra paniculata*, *Clusia columnaris*, *Tovomita longifolia*, *Garcinia madruno*, *Tovomita brasiliensis* e *Clusia grandifolia*. Vale destacar que dentre as classes de compostos

responsáveis pelas atividades mencionadas nestas espécies estão as xantonas, saponinas, terpenos, cumarinas, antraquinonas e flavonóides (ANDRADE, 1997; CECHINEL FILHO, 2000; PINHEIRO et al., 2003; SUFREDINI et al., 2006).

Na família Clusiaceae, cabe destacar o gênero *Clusia* com mais de 250 espécies, sendo algumas extensamente estudadas em função de suas propriedades farmacológicas, como a *Clusia rosea*, cujas folhas apresentaram importante atividade anti-HIV, com o isolamento de duas benzofenonas, guttiferona E e xantochimol, as quais foram atribuídas à atividade citopática da infecção do HIV (GUSTAFSON et al., 1992). Das espécies *C. arboricida*, *C. fluminensis*, *C. coclensis* e *C. nemorosa* diversas substâncias foram isoladas, merecendo destaque o agente anti-inflamatório  $\beta$ -sitosterol (ANDRADE, 1997).

A espécie *Clusia nemorosa* mostra-se amplamente distribuída em países da América do Sul e Central, sendo uma espécie com hábito arbustivo-arbóreo, podendo alcançar de 1,5 a 15 metros de altura, vivem em regiões de restinga, mata e adaptam-se bem a áreas alagadas (ANDRADE, 1997 *apud* CORREA, 1984). No Brasil, esta espécie encontra-se em quase todos os estados, com destaque para o litoral nordestino, onde seu uso popular reporta emprego na cicatrização de feridas, cefaléias e inflamações. Essa espécie é conhecida popularmente por diversos nomes, a depender da região onde é encontrada (TABELA 1) (VOLKER, 2007).

**TABELA 1** - Nomes populares atribuídos à espécie *Clusia nemorosa* G. Mey a depender da sua localização o território brasileiro.

Localidade	Nome popular
Amazonas	Apuí, Manga-brava, Mangue-branco
Nordeste	Clusia, Orelha-de-burro, Cebileira, Mucugê bravo
Alagoas (Município de Murici)*	Pororoca

(Fonte: VOLKER, 2007; \*ANDRADE, 1997).

Os escassos registros científicos sobre a espécie *C. nemorosa* mostram-se confusos quando se avalia suas ações terapêuticas e análises fitoquímicas, mesmo sendo utilizada pela medicina popular nordestina para tratamento de processos dolorosos e inflamatórios.

**FIGURA 8** - *Cusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae).



Fonte: <http://www.flickr.com>.

Dados prévios do nosso grupo indicam que o extrato das folhas desta espécie possui efeitos anti-inflamatórios em modelos animais (FARIAS et al., 2011). Além disso, nesse mesmo extrato foi identificada a presença de constituintes com potencial biológico como  $\beta$ -sitosterol, Kaempferol e ácido betulínico (ANDRADE, ALMEIDA, CONSERVA, 1998). Todos estes compostos já foram descritos na literatura como detentores de efeitos antihiperlipidêmico (EL-ALFY et al., 2011), anti-inflamatórios (YUK et al., 2007; NADER e BARAKA, 2012) e antioxidantes (GONG et al., 2011). Assim, estudos que retratem a caracterização dos efeitos terapêuticos e toxicológicos dessa espécie são de extrema importância, tanto para validação do seu uso popular quanto da possibilidade de isolamento de moléculas farmacologicamente ativas que possam servir como protótipos de fármacos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção do extrato de *Clusia nemorosa*

A planta *C. nemorosa* foi coletada na zona da mata do município de Murici, estado de Alagoas, e encaminhada para o Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas (IQB/UFAL). A espécie foi coletada e taxonomicamente identificada pela botânica Rosângela P. de Lyra Lemos do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA-AL), sendo depositada no herbário sob registro MAC-8734.

O extrato testado foi cedido pelo Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais (LPqPN), resultado da dissertação de mestrado de Márcio Roberto de Andrade, intitulada “Constituintes químicos das cascas, folhas e frutos de *C. nemorosa* (Guttiferae)”, orientada pela Profa. Dra. Lúcia Maria Conserva.

Após a coleta, as cascas foram secas espontaneamente a sombra, sendo em seguida moídas para obtenção do pó. A partir das cascas (1000 g) foram feitas sucessivas extrações em hexano a temperatura ambiente com duração de duas semanas. Após a extração, o solvente foi removido usando evaporador rotativo, obtendo-se 71,8 g de EHC (ANDRADE, 1997). O extrato foi diluído em solução salina acrescida de 5% de etanol.

### 4.2 Animais

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, pesando entre 25-35 gramas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas, respeitando o ciclo claro-escuro de 12 h a temperatura de 24° C, com acesso a ração e água. Cada grupo foi composto de 6 a 8 animais. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional (Protocolo nº 12614/2006-89).

### 4.3 Tratamento

Para avaliar o efeito antinociceptivo da espécie estudada foram usadas como controles solução salina (NaCl 0,9%), indometacina (20 mg/Kg), morfina (5 mg/Kg) e diazepam (10 mg/kg). O extrato hexânico obtido das cascas do caule de *C. nemorosa* (EHC) foi administrado em diferentes concentrações (1 – 200 mg/kg). Para o ensaio de toxicidade aguda, os camundongos foram tratados por até 7 dias consecutivos com o EHC (47 mg/kg) por via intraperitoneal. Todas as substâncias usadas como controle e teste foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) no volume de 0,1 mL/10 g de animal. Todos os fármacos de referência foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Em outro grupo experimental, animais foram tratados com friedelina, um triterpeno pentacíclico, isolada do EHC e fornecido pela Dra. Lucia Conserva para realização dos testes farmacológicos.

Para indução do estímulo nociceptivo foi utilizado ácido acético (0,8%), i.p., no volume de 0,1 mL/10g de animal ou formalina (1%) subplantar utilizando a pata traseira direita do animal no volume de 0,1 mL. No modelo de placa quente, a indução da nocicepção foi feita através de estímulo térmico (54° C). Para indução do edema de pata, foi utilizado 0,05 mL de carragenina (300 µg/pata) traseira esquerda do animal e 0,05 mL de salina (0,9%) na pata traseira direita como controle.

### 4.4 Avaliação da atividade anticociceptiva do extrato de *Clusia nemorosa*

#### 4.4.1 Nocicepção induzida pela administração intraperitoneal de ácido acético

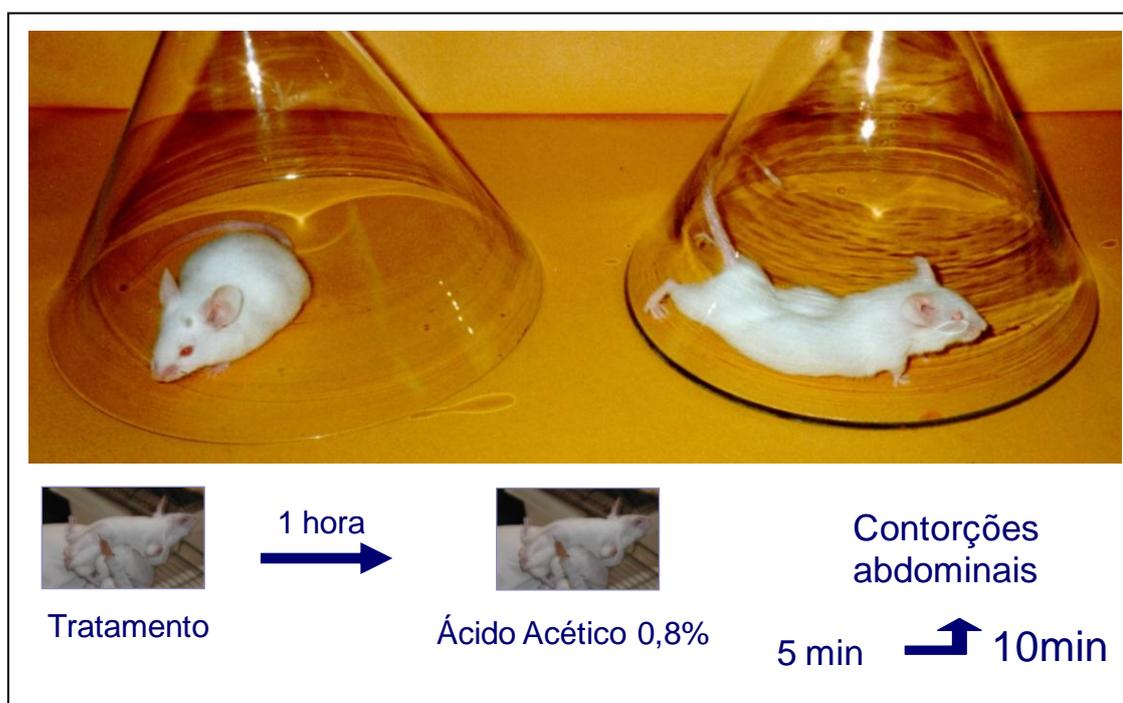
Inicialmente, a atividade antinociceptiva do extrato de *C. nemorosa* foi avaliada através do teste de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos (COLLIER et al., 1968). Trata-se de um modelo de fácil execução, econômico e eficaz para verificar se substâncias possuem atividade antinociceptiva. Neste modelo, como estímulo nociceptivo utilizou-se da administração intraperitoneal de ácido acético (0,8%) diluído em água destilada.

O extrato foi administrado por via intraperitoneal 60 minutos antes da aplicação do estímulo nociceptivo nas concentrações de 1-200 mg/Kg. Após aplicação do estímulo na cavidade peritoneal, os animais foram colocados em funis de vidro invertido individualmente e depois de decorridos 5 minutos, foram contadas

de maneira cumulativa por 10 minutos o número de contorções abdominais. O fenômeno nociceptivo foi observado pela contração da musculatura abdominal acompanhada da distensão de pelo menos uma das patas traseiras, como visualizado na FIGURA 9.

Neste modelo foi obtido a Dose Inibitória de 50% (DI<sub>50</sub>) como sendo a dose capaz de reduzir a resposta nociceptiva em 50% do valor quando comparado ao grupo controle. Sendo assim, a obtenção dos valores de DI<sub>50</sub>, foi feita através da curva de regressão linear, com auxílio do software Graphpad Prisma 4 for Windows, utilizando-se dos valores dos testes de contorções abdominais (1-200 mg/Kg).

**FIGURA 9** - Representação da metodologia de contorção abdominal em camundongos induzida por ácido acético 0,8%.



#### 4.4.2 Efeito temporal da ação antinociceptiva do extrato de *Clusia nemorosa*

Seguindo a metodologia de nocicepção induzida por ácido acético, os animais foram avaliados em diferentes tempos (30, 60, 120, 240 e 480 minutos) após a administração do EHC com o propósito de avaliar o tempo de efeito antinociceptivo.

#### 4.4.3 Avaliação do mecanismo de ação do extrato de *Clusia nemorosa* no modelo de contorção abdominal por ácido acético

Com o objetivo de investigar qual (is) possível (is) via (s) de antinocicepção envolvida (s) no efeito antinociceptivo do EHC, foram utilizados diferentes antagonistas de receptores classicamente conhecidos devido ao seu envolvimento na via descendente de nocicepção. Com este propósito, os animais foram divididos em grupos e tratados com os diferentes antagonistas por via intraperitoneal e 15 minutos (HESS et al., 2010) após receberam o EHC (47 mg/kg; i.p.). Após 60 minutos do tratamento com o extrato os animais foram estimulados com ácido acético e tiveram o número de contorções abdominais registrados (FIGURA 10). Foram utilizados antagonistas de receptores opióides (naloxona 5 mg/kg),  $\alpha$ 2-adrenérgico (ioimbina 1 mg/kg), muscarínico (atropina 5 mg/kg), dopaminérgico D2 (haloperidol 2 mg/kg) e antagonistas de receptores serotoninérgico e dopaminérgico (metoclopramida 1 mg/kg). Além destes, foi investigado o potencial envolvimento do óxido nítrico (L-NAME (N(G)-nitro-L-arginine methyl ester) 20 mg/kg) na atividade antinociceptiva do extrato.

**FIGURA 10:** Avaliação do mecanismo de ação do EHC através do bloqueio de antagonistas de receptores envolvidos na transmissão do processo doloroso.



#### 4.4.4 Nocicepção induzida por estímulo térmico

Para avaliação da nocicepção por estímulo térmico, utiliza-se o teste de placa quente (Insight®, Brazil; modelo EFF-361), onde os animais são colocados em contato com uma chapa aquecida a  $54 \pm 1^\circ \text{C}$  e registrado o tempo que o animal leva para perceber o estímulo térmico como nocivo evidenciado através da retirada brusca de uma ou ambas as patas traseiras da placa aquecida (KURASHI et al., 1983). Os animais foram tratados com o EHC 60 minutos antes de serem colocados em contato com a chapa aquecida. Como controles os animais foram tratados com salina 0,9% ou morfina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal.

#### 4.4.5 Nocicepção induzida por formalina

Este teste foi realizado seguindo o procedimento descrito por Hunskaar e Hole (1987) com o propósito de avaliar a nocicepção neurogênica, como aquela que decorre imediatamente após aplicação do estímulo nociceptivo, e a nocicepção inflamatória, que decorre da ação de mediadores inflamatórios. Para este fim, camundongos foram tratados com o EHC 60 minutos antes do estímulo nociceptivo. O estímulo foi dado através da injeção intra-plantar (i. pl.) na pata traseira direita do animal com uma solução de 0,1 mL de formalina 1%.

O modelo consiste no registro do tempo em que o animal permanece lambendo e/ou mordendo a pata estimulada durante os 5 primeiros minutos (1ª fase - neurogênica), imediatamente após a aplicação do estímulo. Após um intervalo de 10 min, o registro por 15 min do tempo de lambida da pata estimulada, período que se refere a 2ª fase – inflamatória.

#### **4.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hexânico de *Clusia nemorosa***

Para verificar se o extrato hexânico de *C. nemorosa* seria capaz de modular outros parâmetros inflamatórios, foi utilizado o modelo de edema de pata em camundongos provocado por carragenina (BARROS et al., 2011). A análise da formação do edema de pata foi realizada utilizando-se o aparelho de pletismômetro (Panlab, Itália). O equipamento possui duas cubetas de acrílico ligadas através de sistema de vasos comunicantes preenchidas com uma solução contendo salina (0,45 %) e triton (1 %). Para verificar o edema formado, a pata do camundongo é imersa até a junção tíbio-torácica em uma das cubetas, e o volume deslocado para a segunda cubeta – proporcional ao volume da pata imersa – é medido com auxílio de um sensor eletrônico de volume e registrado. Como estímulo inflamatório, os animais receberam uma injeção intraplantar de uma solução de carragenina (300 µg/pata) na pata traseira esquerda (0,05 ml/pata). A pata traseira direita recebeu o mesmo volume de solução salina (0,9%) como controle. Os animais foram tratados 1 hora antes do estímulo por via i.p. com o EHC (47 mg/kg), salina (0,9%) ou indometacina (20 mg/kg). Após o estímulo com carragenina o volume de cada pata foi avaliado nos tempos de 4, 24 e 48 h, sendo os valores expressos em microlitros (µL) de acordo

com a seguinte fórmula:

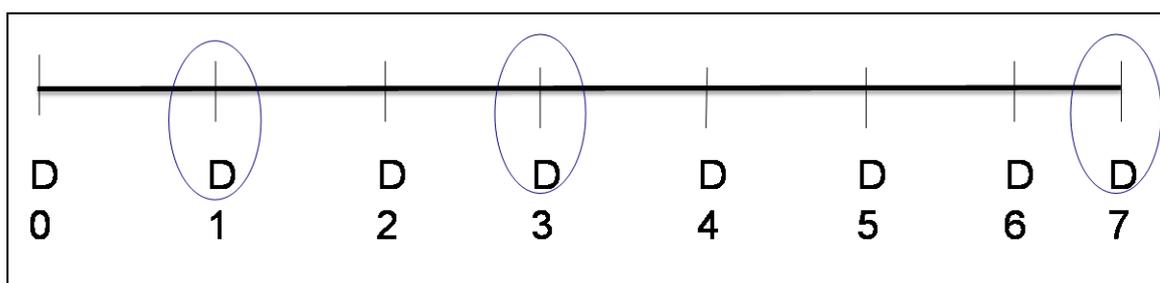
$$\Delta \text{ Volume } (\mu\text{L}) = (\text{volume da pata esquerda}) - (\text{volume da pata direita})$$

#### 4.6 Avaliação de efeitos toxicológicos do extrato hexânico de *Clusia nemorosa*

##### 4.6.1 Avaliação dos efeitos de toxicidade sistêmica em camundongos

Para verificar os possíveis efeitos tóxicos do EHC os animais foram tratados por até 7 dias consecutivos com o extrato na dose de 47 mg/kg (i.p.) ou salina (0,9%), em um volume final de 0,1 ml/ 10 g de peso do animal. Após o tratamento os animais foram avaliados por até 4 h consecutivas. Seguindo o protocolo da ANVISA (RDC 90/04) diferentes parâmetros foram avaliados, incluindo comportamento (alteração locomotora, frequência respiratória, piloereção (ereção ou eriçamento involuntário dos pêlos), diarreia, sialorréia (lacrimejamento), sedação/agitação, hipnose, convulsões, contorções abdominais), ocorrência de morte. As avaliações foram feitas 24, 72 e 168 h após o tratamento consecutivo com o EHC, como mostra a FIGURA 11.

**FIGURA 11** – Período de avaliação do EHC no ensaio de toxicidade aguda.

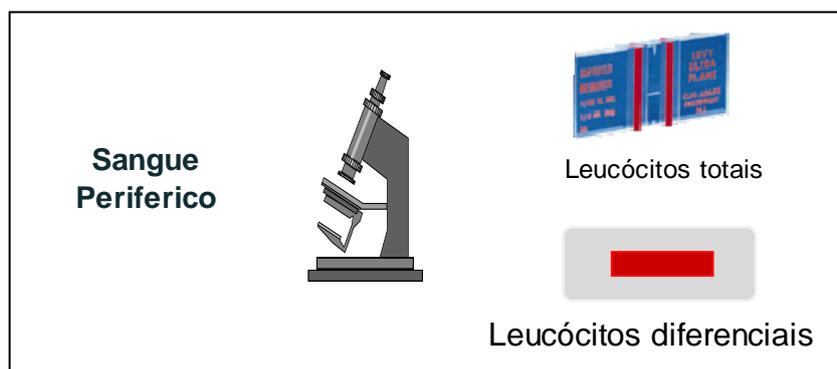


Os animais foram divididos em grupos tratados com EHC ou salina (0,9%) e diferentes grupos foram avaliados nos Dias (D) 1, 3 ou 7 após o tratamento.

#### 4.6.2 Avaliação de leucócitos do sangue periférico dos camundongos tratados com o extrato de *Clusia nemorosa*

Para verificar se o tratamento com o EHC mostra-se capaz de provocar alterações na celularidade sanguínea, amostras (5  $\mu$ L) de sangue obtido da extremidade da cauda do animal foram diluídas em líquido de Turk (295  $\mu$ L) para contagem de leucócitos totais na câmara de Neubauer com auxílio do microscópio óptico (Olympus<sup>®</sup>, Modelo BX41, Japão). Para contagem dos leucócitos diferenciais, foi realizado esfregaço sanguíneo do sangue periférico. As lâminas foram coradas com o kit de coloração panótico rápido e a leitura realizada com o auxílio de microscópio óptico (FIGURA 12).

**FIGURA 12** – Avaliação da celularidade do sangue periférico dos animais tratados com EHC.



#### 4.6.3 Avaliação do extrato de *Clusia nemorosa* sobre a motricidade dos camundongos no modelo de Rota Rod

Com propósito de avaliar possíveis influências do extrato sobre a locomoção dos animais após tratamento (47 mg/kg), os animais foram submetidos ao teste de Rota Rod (Insight, Modelo EFF 412, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O equipamento constitui-se de uma barra giratória de 3 cm de diâmetro, subdividida em 4 barras, girando a 16 rpm (rotações por minuto). Para realização do teste, foram utilizados apenas animais aptos a permanecerem 240 segundos (s) na barra giratória do equipamento. Para isso, os animais foram condicionados por 2 dias consecutivos, antes da realização do experimento, a permanecerem por 2 tempos de 240 s na barra giratória, sendo considerados aptos e utilizados apenas aqueles que permaneceram os períodos

estabelecidos. No dia do experimento, os animais foram tratados 1h antes de serem colocados na barra giratória com o EHC e salina ou diazepam (10 mg/kg) como controles, e avaliado o tempo de latência dos animais no equipamento (NONATO et al., 2010 *apud* DUNHAM e MYIA, 1957).

#### 4.6.4 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *Clusia nemorosa* sobre macrófagos peritoneais

Para verificar o efeito do EHC sobre a viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de viabilidade *in vitro* por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) utilizando macrófagos peritoneais (MOSMANN, 1983). Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na atividade da mitocôndria devido a redução do MTT através da clivagem do sal tetrazólio em cristais de formazan pela enzima succinato desidrogenase. Para isso, macrófagos peritoneais foram coletados com PBS/EDTA 10 mM, centrifugados em centrífuga refrigerada (Herolab<sup>®</sup>, Modelo Unicer MR, Alemanha) e ressuspensos em 1 mL de meio RPMI/SFB 10%. Em seguida, as células viáveis (verificadas utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán, que cora em azul as células não viáveis) foram plaqueadas na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células/poço, em placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 37 °C por 2 h para adesão dos macrófagos. O EHC foi incubado em diversas concentrações (1, 10, 100 e 500 µg/ml) por 24 h. Como grupos controles, foram utilizados apenas células e meio de cultura ou células tratadas com Tween (3%). Decorridas as 24 h as células foram incubadas com MTT por 4 h. Após a incubação com MTT, os poços foram lavados e adicionado 150 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) por 15 minutos e realizada a leitura em aparelho de espectrofotômetro (Thermo Plate, Modelo RS 232) no comprimento de onda de 540 nm.

#### 4.7 Identificação dos constituintes químicos do extrato de *Clusia nemorosa* por cromatografia gasosa acoplado a Espectro de Massa (CG-MS)

A identificação dos constituintes químicos presentes no extrato de *C. nemorosa* foi realizada utilizando-se o método de CG-MS (Modelo 6890N (G1530N, Agilent Technologies) em colaboração com a Plataforma de Métodos Analíticos de Farmanguinhos - Fiocruz/RJ.

#### **4.8 Análise estatística**

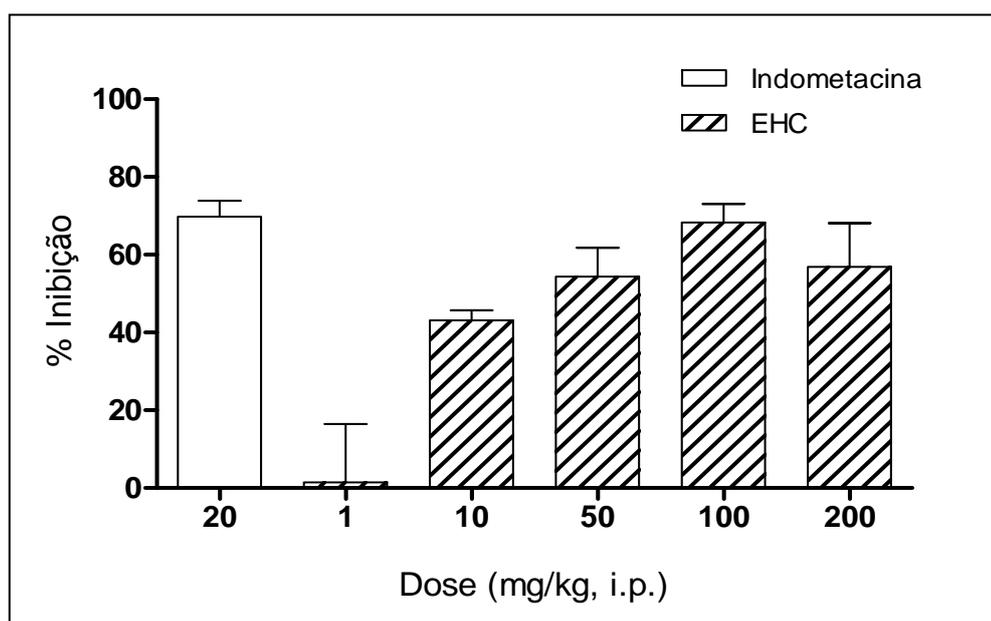
Os resultados foram representados como média  $\pm$  Erro Padrão da Média ( $M \pm E.P.M.$ ) e avaliados estatisticamente por meio da análise de variância e do teste t de Student seguido do teste de comparações múltiplas ANOVA e Newman-Kewls-Student com um nível de significância selecionado para  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito do extrato hexânico de *Clusia nemorosa* sobre a nocicepção induzida por ácido acético

A injeção de ácido acético na cavidade peritoneal dos camundongos foi capaz de induzir uma resposta nociceptiva que se mostrou suprimida pelo tratamento com indometacina, um clássico fármaco utilizado para o tratamento da dor, apresentando cerca de 80% de inibição sobre a atividade nociceptiva. De maneira semelhante, o EHC (FIGURA 13) foi capaz de reduzir de maneira significativa às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Utilizando-se das análises de regressão linear sobre os resultados de percentagem de inibição, a Dose Inibitória de 50% (DI<sub>50</sub>) correspondente ao EHC foi de 47 mg/Kg.

FIGURA 13 - Avaliação da atividade antinociceptiva do EHC.



O extrato foi administrado nas concentrações 1-200 mg/kg por via intraperitoneal, no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos. O extrato foi injetado 1 h antes do ácido acético. As barras representam a média da % de inibição dos grupos tratados com EHC e indometacina.

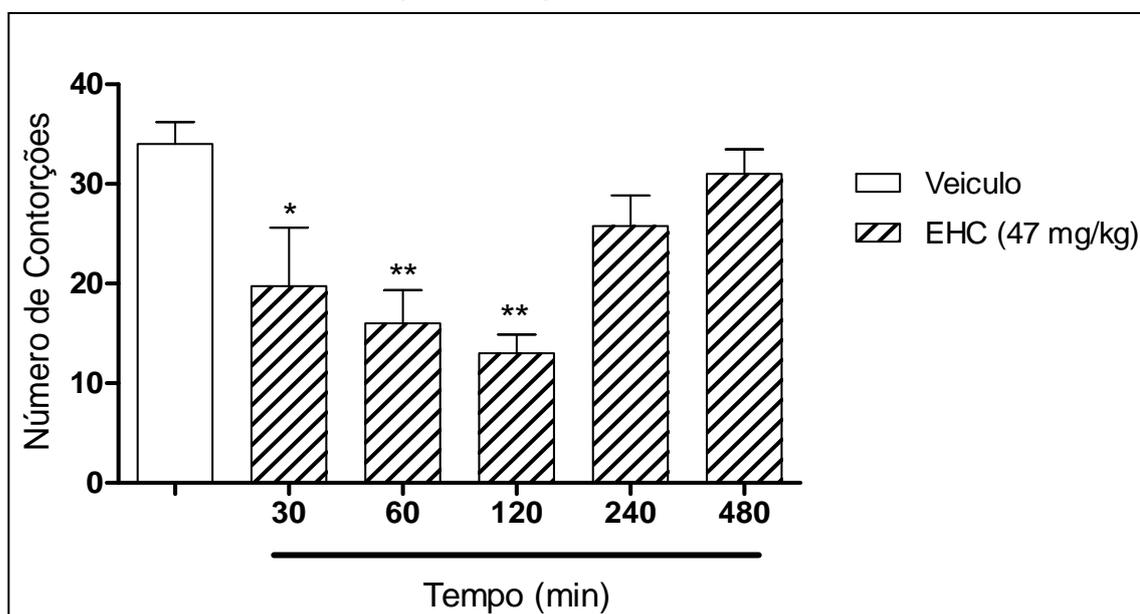
Como o extrato foi diluído em etanol antes da administração no animal, foi avaliado se resíduos de etanol a 5% ou 10% eram capazes de induzir alterações na resposta nociceptiva no modelo estudado. Como resultado, foi observado que concentrações de etanol 5% ( $27 \pm 2,6$  contorções) ou etanol 10% ( $31 \pm 3,3$

contorções) não alteraram de maneira significativa o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético quando comparado ao grupo controle tratado com salina ( $34 \pm 3,0$  contorções), descartando assim o efeito antinociceptivo decorrente da presença de potenciais resíduos de etanol na amostra.

## 5.2 Cinética do efeito antinociceptivo do extrato de *Clusia nemorosa*

Na tentativa de avaliar a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo EHC, os animais foram submetidos ao estímulo álgico com ácido acético em diferentes tempos (30, 60, 120, 240 e 480 min) após tratamento com o extrato. Como mostrado na FIGURA 14, o tratamento com o EHC (47 mg/Kg) revelou um efeito antinociceptivo já em 30 minutos e manteve-se por 120 minutos após o estímulo. A partir do tempo de 240 minutos após o tratamento o extrato não foi capaz de apresentar efeitos antinociceptivos.

FIGURA 14 - Avaliação da duração do efeito antinociceptivo do EHC.

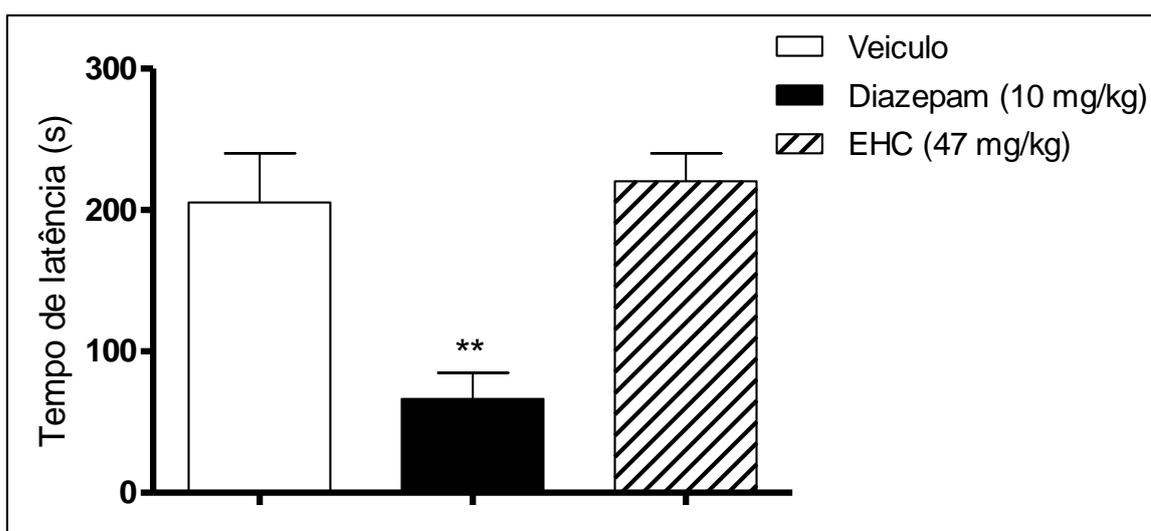


O extrato foi administrado (i.p.) 30, 60, 120, 240 e 480 minutos antes do ácido acético (0,8%) por via intraperitoneal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do total de contorções. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls-Student. (\*\*) e (\*) representam  $P < 0,01$  e  $P < 0,05$ , respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com veículo.

### 5.3 Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* sob a motricidade dos animais

O teste de rota rod permite discriminar efeitos de substâncias com potencial antinociceptivo de substâncias com ação sobre a musculatura por permitir avaliar a motricidade dos animais. Como observado na FIGURA 15, os animais que receberam a injeção intraperitoneal do EHC não tiveram sua capacidade de permanecer na barra giratória alterada quando comparado ao grupo tratado com salina. No entanto, o grupo tratado com diazepam, apresentou uma diminuição significativa do tempo de latência, ou seja, o tempo em que o animal permanece na barra giratória. Dessa forma, o EHC não foi capaz de alterar a capacidade dos animais nesse teste, corroborando assim, para os efeitos antinociceptivos identificados no extrato de *C. nemorosa*.

FIGURA 15 - Avaliação da capacidade motora dos animais tratados com EHC.



O extrato foi injetado 60 minutos antes dos animais serem colocados no equipamento. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da variação do tempo de permanência dos animais na barra giratória. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*) representam  $P < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com veículo.

### 5.4 Investigação do mecanismo de ação do extrato de *Clusia nemorosa*

Com o propósito de elucidar o mecanismo de ação responsável pelos efeitos antinociceptivos do EHC foram utilizados antagonistas de receptores envolvidos no processo de transmissão da dor e inibidor da síntese de óxido nítrico. Como observado na TABELA 2, o tratamento com EHC mostrou-se capaz de suprimir de

modo significativo a resposta nociceptiva dos animais estimulados com ácido acético. O pré-tratamento com os antagonistas naloxona, ioimbina, atropina e haloperidol não modificaram a resposta antinociceptiva induzida pelo EHC. De maneira semelhante, o tratamento com L-NAME, um inibidor da síntese de NO, não reverteu a antinocicepção do extrato. Entretanto, quando os animais foram pré-tratados com metoclopramida, um antagonista de receptor serotoninérgico (5-HT<sub>3</sub>) e dopaminérgico, foi observado uma inibição significativa no efeito antinociceptivo promovido pelo EHC.

**TABELA 2** - Investigação dos receptores envolvidos no mecanismo de ação do EHC.

Pré-tratamento (i.p.)	Grupo	Número de contorções
-	Veiculo	34,1 ± 1,81
-	EHC	14 ± 2,01 ***
Naloxona (5 mg/kg)	EHC	7 ± 2,582***
Ioimbina (1 mg/kg)	EHC	20,8 ± 2,8187
L-NAME (20 mg/kg)	EHC	9,8 ± 2,956***
Atropina (5 mg/kg)	EHC	17,17 ± 2,613**
<b>Metoclopramida (1 mg/kg)</b>	<b>EHC</b>	<b>25,67 ± 2,404 +</b>
Haloperidol (2 mg/kg)	EHC	12 ± 1,958***

O extrato, antagonistas e salina foram administrados i.p.. Cada valor representa a média ± EPM. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. (\*\*\*) e (\*\*) denota nível de significância comparado ao respectivo grupo tratado com veiculo, onde (\*\*\*) corresponde a  $p < 0,001$  e (\*\*) a  $p < 0,01$ . (+) denota o nível de significância entre os grupos EHC e Metoclopramida, onde (+) corresponde a  $p < 0,01$ .

### 5.5 Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* sob a nocicepção induzida por estímulo térmico

Buscando avaliar o envolvimento de mecanismos centrais na antinocicepção detectada no extrato de *C. nemorosa*, foi utilizado o modelo de placa quente em camundongos. De acordo com a TABELA 3, o EHC (47 mg/Kg) não foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência na percepção do estímulo nociceptivo no modelo de placa quente (54°C) após tratamento 60 minutos antes da aplicação do estímulo. Entretanto, o grupo tratado com morfina revelou um aumento significativo no tempo de latência. Assim, verificamos neste ensaio que os animais permaneceram com o mesmo perfil de nocicepção térmica quando comparado ao

grupo controle tratado com salina (0,9%), indicando que os efeitos antinociceptivos do extrato parecem não decorrer de uma ação central.

**TABELA 3** - Tempo de latência do EHC quando submetidos ao estímulo térmico.

<b>Grupo</b>	<b>Concentração (mg/kg)</b>	<b>Tempo de latência (s)</b>
Veículo	-	9,8 ± 5,9
EHC	47	15,3 ± 4,3
Morfina	5	20,0 ± 1,9 **

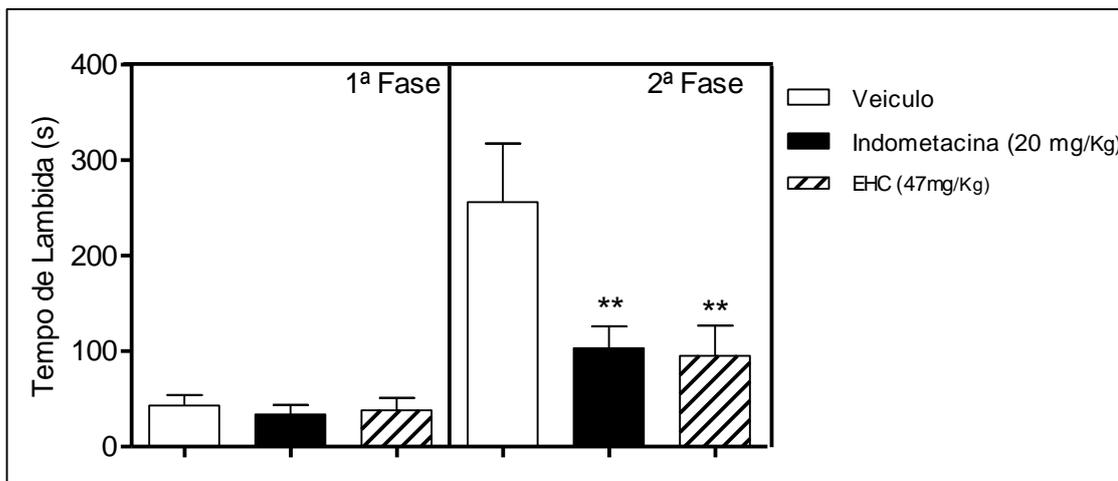
O extrato, morfina ou salina foram administrados i.p. 1 h antes da exposição à placa aquecida. Cada valor representa a média ± EPM. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. (\*\*) denota nível de significância comparado ao respectivo grupo tratado com veículo, onde \*\* corresponde a  $p < 0,01$ .

### **5.6. Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* sob a nocicepção induzida por formalina**

O teste da formalina foi escolhido para dar continuidade aos estudos, por permitir diferenciar a dor de origem neurogênica (1ª fase), iniciada imediatamente após a aplicação do estímulo, da dor de origem inflamatória (2ª fase), iniciada 15 minutos após a aplicação do estímulo nociceptivo. Dessa maneira, esta metodologia mostra-se útil para discriminar substâncias com potenciais analgésicos distintos.

De acordo com a FIGURA 16, o tratamento prévio dos animais com EHC (47 mg/Kg) induziu uma redução no tempo de lambida da pata estimulada apenas na 2ª fase, sendo capaz de inibir a etapa correspondente à dor de origem inflamatória provocada pela injeção de formalina (1%).

**FIGURA 16** - Avaliação da atividade antinociceptiva do EHC induzida por formalina.

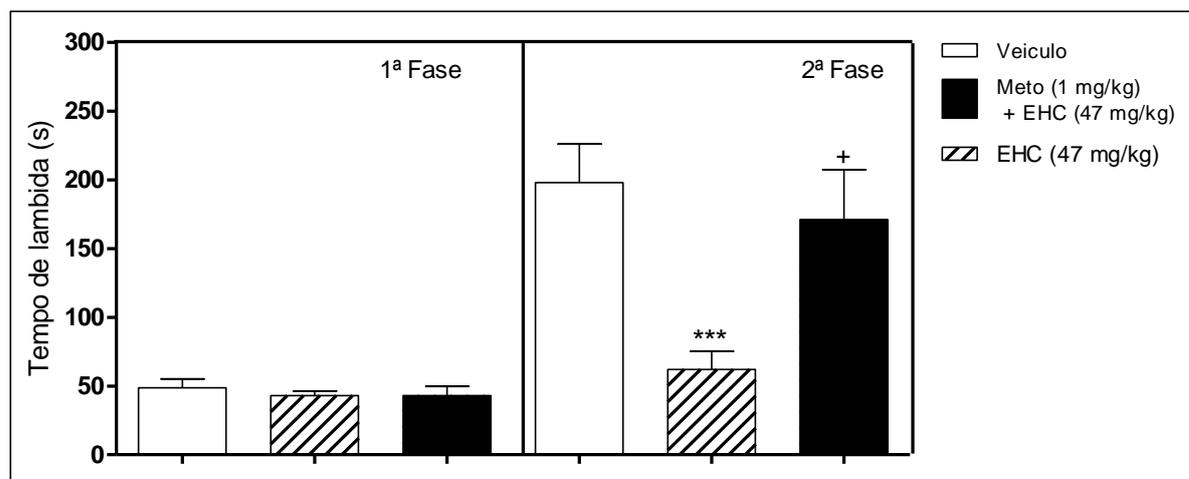


O extrato foi injetado 60 minutos antes da formalina por via intraperitoneal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do total de contorções. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*) representam  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com veículo.

Os animais que receberam indometacina (20 mg/kg) também apresentaram perfil de ação semelhante ao extrato neste teste, ou seja, animais tratados com indometacina não exibiram alteração significativa da resposta nociceptiva na fase neurogênica (0 a 5 min), porém a dor inflamatória (15 a 30 min) foi significativamente inibida.

Utilizando-se do potencial evidenciado pelo teste de formalina, os animais foram pré-tratados 15 minutos antes de receberem o EHC (47 mg/kg) com a metoclopramida (1 mg/kg), um antagonista de receptores serotoninérgico e dopaminérgico, visando confirmar o envolvimento desses receptores no efeito antinociceptivo do EHC na dor de origem inflamatória. Dessa forma, como ilustrado na FIGURA 17, o EHC teve seus efeitos antinociceptivos bloqueados quando os animais receberam o pré-tratamento com metoclopramida.

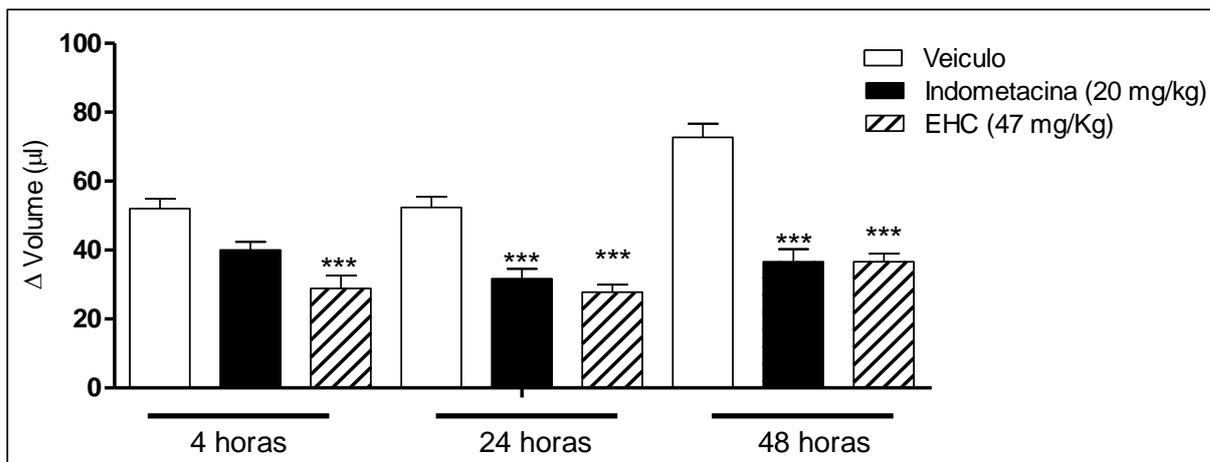
**FIGURA 17** - Avaliação do envolvimento do receptor serotoninérgico na atividade antinociceptiva do EHC induzida por formalina.



A metoclopramida foi administrada 15 minutos antes da administração do extrato. O extrato foi injetado 60 minutos antes da formalina por via intraperitoneal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do total de contorções. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls-Student. (\*\*\*) representam  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo tratado com veículo. (+) representa  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo EHC.

### 5.7 Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* no modelo de edema de pata induzido por carragenina

Para avaliar o efeito anti-inflamatório do EHC, foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Como mostrado na FIGURA 18, a injeção de carragenina na pata dos animais foi capaz de induzir edema nos tempos de 4, 24 e 48 horas. O EHC foi capaz de inibir de maneira significativa o edema de pata em todos os tempos avaliados após o estímulo com carragenina, agindo assim, em tempos agudos e tardios do processo inflamatório. De maneira semelhante, a indometacina (20 mg/kg), um anti-inflamatório não esteroideal reduziu de forma significativa o edema nos tempos mais tardios.

**FIGURA 18** - Avaliação da atividade anti-edematogênica do EHC.

O EHC foi administrado 60 minutos antes da carragenina por via intraperitoneal, pela administração de carragenina (300μg/pata). O extrato foi injetado 60 minutos antes do estímulo. As barras representam a média ± E.P.M. da variação do volume da pata estimulada – a pata não estimulada. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*\*) representam  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo tratado com veículo.

### 5.8. Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* sob a celularidade sanguínea

A TABELA 4 apresenta os valores da contagem total e diferencial de leucócitos obtidos do sangue periférico dos animais tratados com o EHC após 1, 3 e 7 dias de tratamento. Como evidenciado na tabela, não houve alteração na contagem de leucócitos totais após o tratamento com o EHC quando comparado ao grupo tratado com salina. Da mesma forma, o extrato não foi capaz de provocar alteração no número dos tipos celulares (mononucleares, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) avaliados mesmo após 7 dias consecutivos de tratamento.

Quando avaliados parâmetros comportamentais, como sedação, sonolência, agitação, ocorrência de diarreias, sialorréia ou piloereção, não foi observada nenhuma alteração nos animais quando tratados por até 7 dias com o extrato em comparação ao grupo controle tratado com salina em todos os intervalos de tempo avaliados. Também não foi observada alteração no peso corpóreo do animal, sugerindo não alterar os hábitos alimentares do animal. De acordo com os resultados com tratamento i.p. por até 7 dias com o EHC não foi observado efeitos tóxicos sistêmicos dentre os parâmetros avaliados. Além disso, a observação dos órgãos da cavidade torácica e peritoneal após eutanásia não revelou alteração macroscópica perceptível após tratamento com o extrato.

**TABELA 4** - Contagem de leucócitos totais e diferenciais de sangue periférico após tratamento com o extrato de *C. nemorosa*.

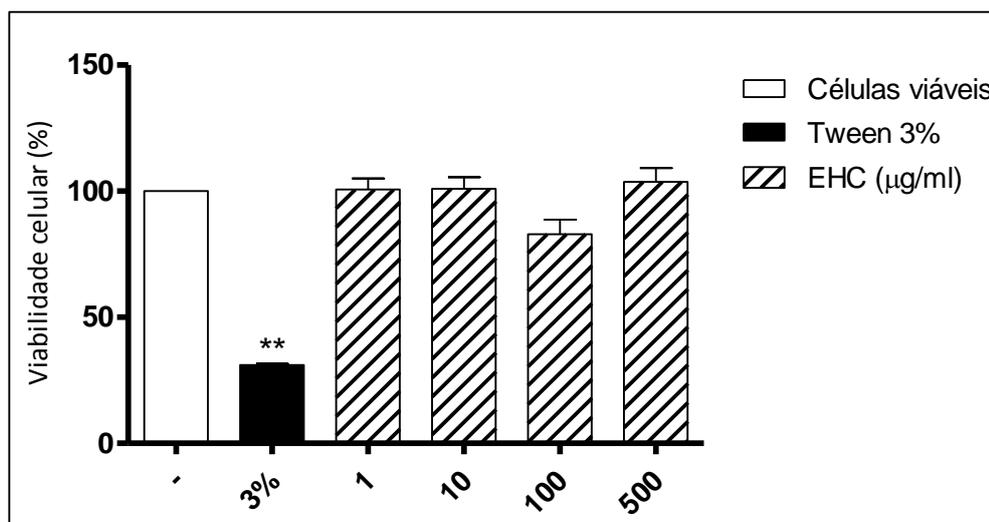
Dia	Grupo	Leucócitos totais (x 10 <sup>3</sup> mm <sup>3</sup> )	Tipos celulares			
			Mononuclear	Linfócito	Neutrófilo	Eosinófilo
1	Veiculo	33,25 ± 1,31	14 ± 1	26,5 ± 1,5	57,7 ± 0,62	1,75 ± 0,62
	EHC	31 ± 3,65	11,5 ± 0,64	32 ± 2,1	55,7 ± 1,7	0,75 ± 0,47
3	Veiculo	33,25 ± 1,31	14 ± 1	26,5 ± 1,5	57,7 ± 0,68	1,75 ± 0,68
	EHC	43,75 ± 5,13	8,5 ± 0,95	34,7 ± 1,8	56,7 ± 1,65	0,5 ± 0,28
7	Veiculo	52,25 ± 3,09	13,7 ± 0,05	36,5 ± 1,7	49 ± 2,4	0,75 ± 0,47
	EHC	49 ± 2,19	10,2 ± 1	37 ± 1	52,2 ± 1,93	0,5 ± 0,28

O extrato ou veiculo foram administrados i.p. por até 7 dias consecutivos. Cada valor representa a média ± EPM. As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

### 5.9. Efeito do extrato de *Clusia nemorosa* sob a viabilidade celular *in vitro*

A Figura 19 apresenta a porcentagem de viabilidade de macrófagos peritoneais expostos ao EHC após 24h de incubação. O EHC em todas as concentrações testadas, não foi capaz de alterar de maneira significativa a viabilidade das células quando comparado ao grupo tratado apenas com meio de cultura (controle, 100% de viabilidade).

**FIGURA 19** - Efeito do EHC sobre a viabilidade celular avaliado pelo teste de MTT.



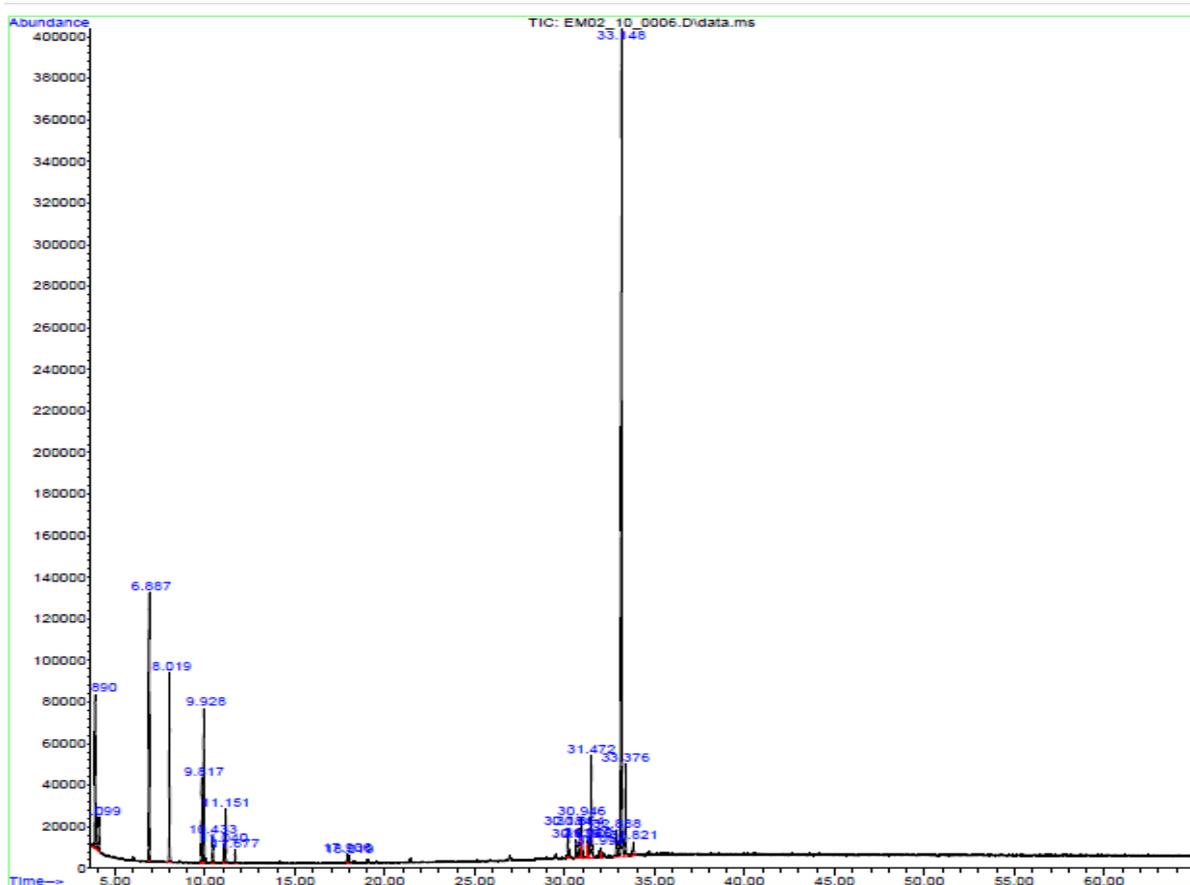
As células foram expostas ao extrato por 24h antes da avaliação da viabilidade. As barras representam a média ± E.P.M. da viabilidade das células. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*) representam p<0,01 quando comparado ao grupo de células viáveis.

## 5.10 Identificação dos constituintes químicos do extrato de *Clusia nemorosa* por CG-MS

Com propósito de identificar os constituintes químicos presentes no EHC capazes de responder pelas atividades farmacológicas do extrato, foi realizado o ensaio de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectometria de Massas. Como evidenciado na Figura 20, diversos constituintes químicos puderam ser detectados no extrato. No entanto, um destes componentes apresentou-se em maior abundância no extrato, sendo identificado no tempo de retenção de cerca de 33,48 minutos. Trata-se de um triterpeno pentacíclico, denominado de friedelina.

O princípio de análise da CG está na separação dos constituintes voláteis e na sua partição entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. Esta análise apresenta a vantagem ao usar pouca quantidade de amostra, ordem de miligramas, para identificação dos constituintes, além de ser um método seguro e eficaz na identificação dos constituintes presentes nas amostras (DERGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

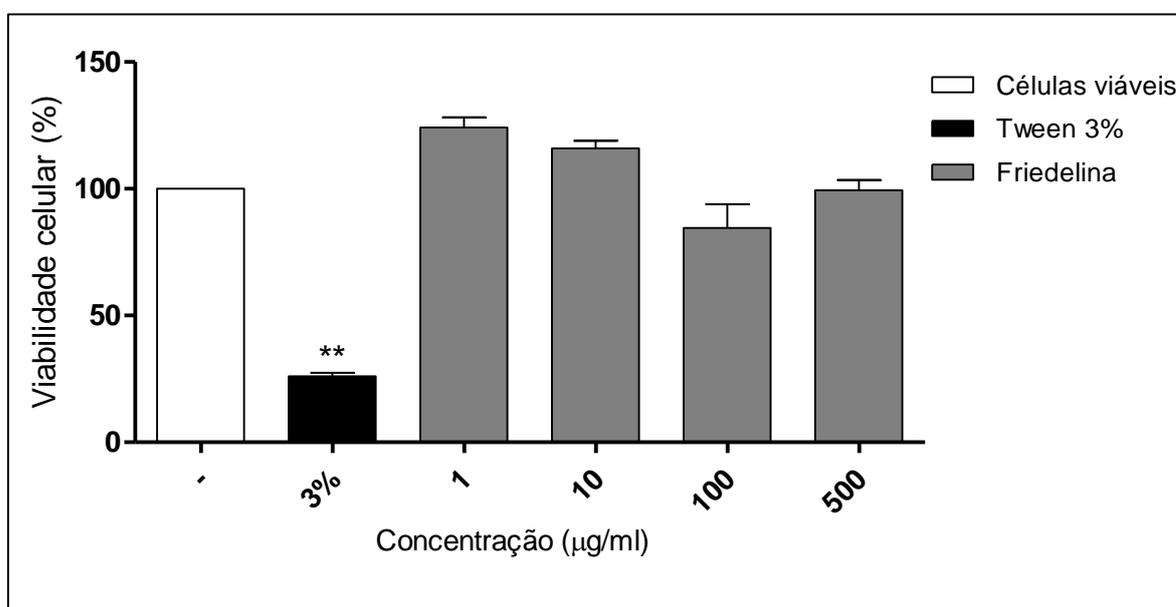
**FIGURA 20** - Cromatograma obtido por CG-MS da análise do EHC.



### 5.11 Efeito da friedelina sob a viabilidade celular *in vitro*

Após a identificação do constituinte químico majoritário presente no extrato de *C. nemorosa*, nossos estudos tiveram como objetivo de avaliar se esse componente poderia responder pelos efeitos farmacológicos do EHC. Inicialmente, foi realizado o teste *in vitro* de toxicidade celular pelo método de MTT. Como evidenciado na FIGURA 21, a friedelina não foi capaz de diminuir a viabilidade dos macrófagos peritoneais, em todas as concentrações testadas quando expostas as células por 24h.

FIGURA 21 - Efeito da friedelina sobre a viabilidade celular avaliado pelo teste de MTT.



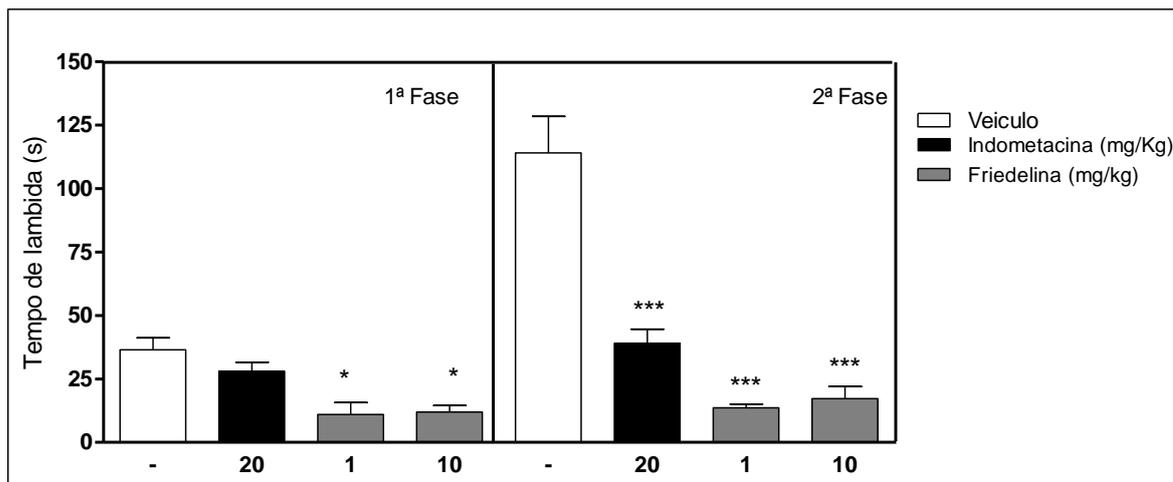
A substância foi incubada por 24h antes da incubação com o MTT. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da viabilidade das células. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*) representam  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo de células viáveis.

### 5.12 Efeito antinociceptivo da friedelina no modelo de formalina

Para avaliar o efeito antinociceptivo do triterpeno isolado de *Clusia nemorosa*, foi escolhido o modelo de formalina 1%. Como mencionado anteriormente, este modelo é dividido em duas fases, permitindo avaliar se a substância analisada possui efeito sobre a dor de origem neurogênica e dor inflamatória. Como evidenciado na Figura 22, o triterpeno isolado do EHC foi capaz de reduzir de maneira bastante significativa o fenômeno nociceptivo no modelo de formalina. Além de inibir a dor inflamatória como EHC, inibiu também a dor neurogênica de maneira

bastante significativa, sugerindo efeitos distintos do EHC. De acordo com o efeito observado na primeira fase do teste, é sugestivo da presença de outros constituintes químicos com propriedades farmacológicas, que podem estar atuando de maneira a inibir a ação da friedelina no EHC, não sendo evidenciado seu efeito na fase neurogênica da dor.

**FIGURA 22-** Avaliação da atividade antinociceptiva da friedelina no modelo de formalina.

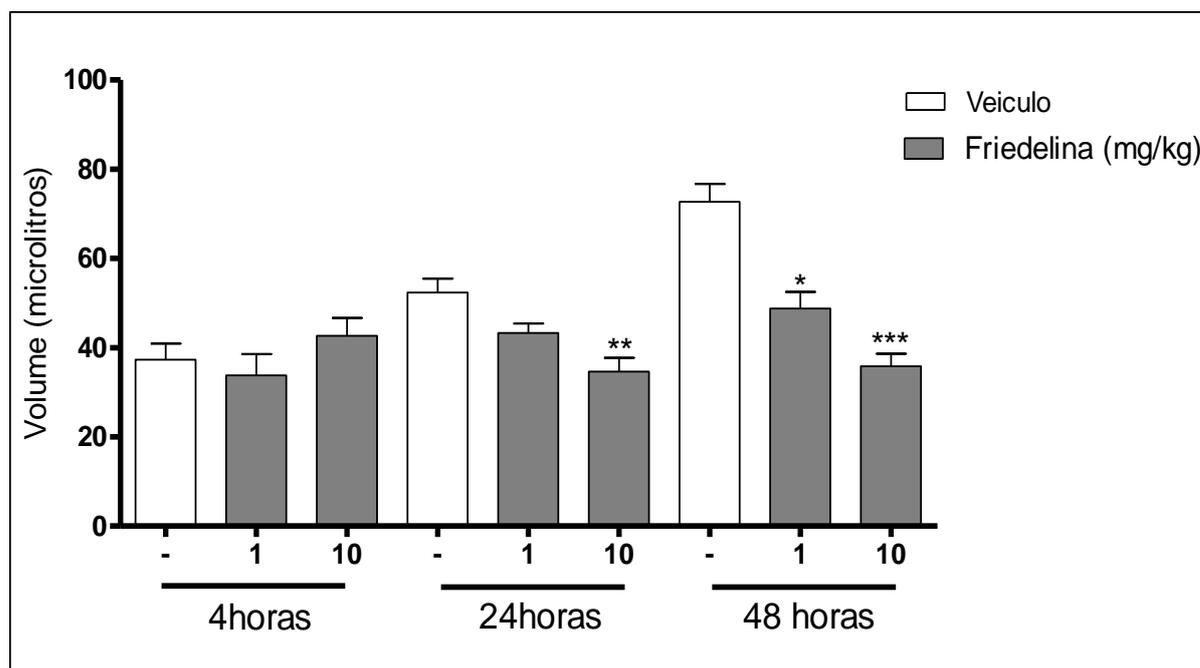


A substância foi injetada 60 minutos antes da formalina por via intraperitoneal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do total de contorções. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*) e (\*\*) representam, respectivamente,  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo salina.

### 5.13 Efeito da friedelina no modelo de edema de pata por carragenina

Assim como o EHC apresentou efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata por carragenina, investigamos se a friedelina também possui tais efeitos. Para isso, foi utilizado o modelo de edema de pata por carragenina. Como evidenciado na Figura 23, a friedelina foi capaz de reduzir de maneira significativa o edema induzido por carragenina. No entanto, de maneira diferente do EHC, que foi capaz de reduzir o edema em tempos mais agudos, a friedelina só foi capaz de reduzir o edema em tempos mais tardios, sendo o edema de 24h inibido apenas pela maior dose testada (10 mg/kg). Estes resultados sugerem mais uma vez a presença de constituintes químicos diversos com propriedades farmacológicas que podem agir de maneira sinérgica, proporcionando os efeitos antiedematogênicos observados no EHC em tempos mais agudos no modelo testado.

**FIGURA 23** - Avaliação da atividade anti-inflamatória da Friedelina no modelo de edema de pata por carragenina.

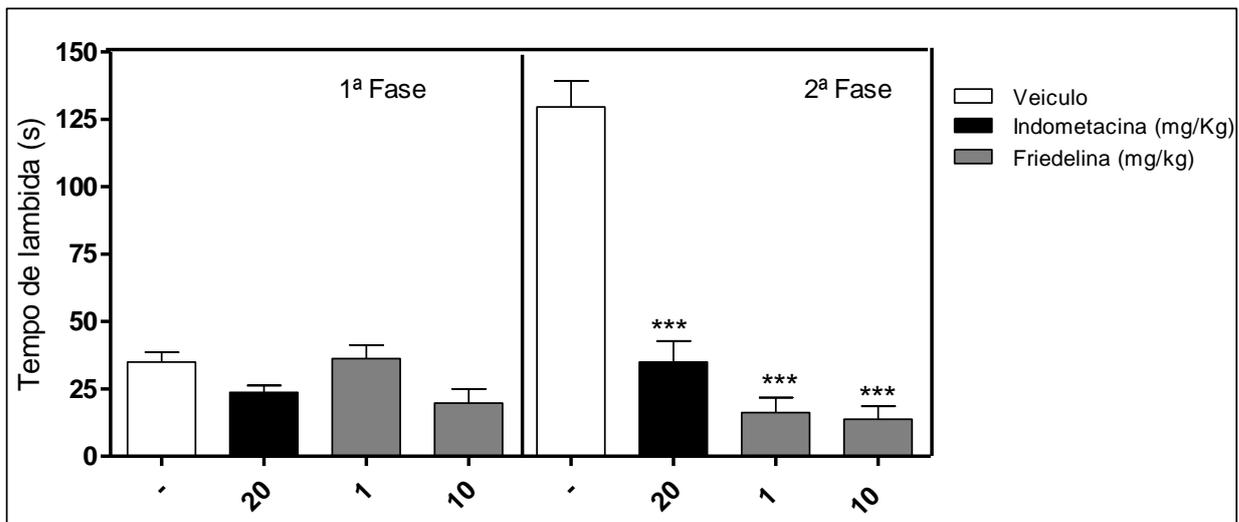


A substância foi injetada 60 minutos antes do estímulo por via intraperitoneal. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da variação do volume da pata estimulada – a pata não estimulada. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) representam, respectivamente,  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  quando comparados ao grupo tratado com salina.

#### 5. 14 Efeito do tratamento via oral da friedelina na nocicepção induzida por formalina

De acordo com os resultados obtidos até o momento, evidenciamos que o EHC possui atividade antinociceptivas e anti-inflamatórias importantes e que a friedelina, seu componente majoritário, mostrou-se capaz de exercer os mesmos efeitos em doses menores, sem, contudo, alterar a viabilidade celular. Sendo assim, foi avaliado se a friedelina seria capaz de manter seus efeitos antinociceptivos quando administrada por via oral. Como apresentado na Figura 24, a friedelina quando administrada por via oral, mostrou-se eficaz em inibir apenas a dor de origem inflamatória, sugerindo que nas doses testadas o triterpeno mantém seus efeitos farmacológicos, mas não é capaz de inibir a dor neurogênica evidenciada no teste.

**FIGURA 24** - Avaliação da atividade antinociceptiva da friedelina no modelo de formalina tratado por via oral.



A substância foi injetada 60 minutos antes da formalina por via oral. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. do total de contorções. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newman-Keuls. (\*\*\*) representam  $p < 0,01$  quando comparado ao grupo salina.

## 6 DISCUSSÃO

O estudo de produtos naturais, em especial de plantas medicinais, há anos ganha destaque no cenário da pesquisa mundial. No Brasil, o número de trabalhos com o intuito de estudar a biodiversidade do país, é cada vez maior e contribui de maneira significativa para aumentar o arsenal terapêutico disponível e, além disso, promover a comprovação científica do conhecimento popular (MACIEL; PINTO; VEIGA JÚNIOR, 2002).

No Brasil, as plantas são comercializadas, em sua maioria, em feiras livres e quintais de residências, sendo algumas espécies de plantas comercializadas em farmácias e lojas que vendem produtos naturais. No entanto, o comércio e consumo desses produtos são feitos, na maior parte das vezes, sem nenhuma comprovação científica do potencial farmacológico e toxicológico, além da falta de fiscalização pelos órgãos competentes que possam garantir o uso racional e seguro pela população (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Estudos etnofarmacológicos e taxonômicos de espécies da flora brasileira merecem atenção especial, principalmente, pelo fato de que dados da década de 90 da OMS indicam que em países em desenvolvimento, entre 65% - 80% da população fazem uso de plantas medicinais para tratamento de diversas enfermidades (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Portanto, dentro da imensa biodiversidade do Brasil, espécies da família Clusiaceae mostram-se possuidoras de importantes propriedades terapêuticas. Dentro dessa família são encontradas diversas classes de metabólitos, como xantonas, benzoquinonas, flavonóides e terpenos, possuidores de propriedades farmacológicas importantes. Como exemplo destaca-se as espécies do gênero *Calophyllum*, em especial a *C. brasiliense*, onde seus extratos mostraram-se possuidores de atividades anti-HIV e antinociceptivas (NOLDIN; ISAIAS; CECHINEL-FILHO, 2006). Além de diversas espécies com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, de onde foi isolada a substância 13, 118-Binarigenin, um biflavonóide isolado da espécie *Clusia columnaris* que possui atividade antinociceptiva evidenciada nos modelos de contorção abdominal por ácido acético e formalina (BITTAR et al., 2000). Da espécie *Garcinia brasiliensis* Planch & Triana foi isolada a benzofenona 7-epiclusianona que possui atividades antiproliferativa (MURATA et al., 2010), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), vasodilatador do

endotélio (CRUZ et al., 2006) e atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias (SANTA-CECILIA et al., 2011). A busca por compostos bioativos que possam apresentar eficácia e segurança no tratamento de diversas desordens mostra-se relevante, encontrando na família Clusiaceae um vasto arsenal de espécies a serem estudadas visando comprovar seu potencial biológico, já bastante explorado pelo conhecimento popular.

Diante deste cenário, nosso grupo vem contribuindo com o conhecimento a respeito das ações farmacológicas da espécie *C. nemorosa* que já teve comprovada sua atividade anti-inflamatória detectada no extrato hexânico obtido a partir de das folhas (FARIAS et al., 2011).

Assim, no presente estudo buscamos estender nossas análises avaliando o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hexânico obtido a partir das cascas do caule de *C. nemorosa*, chamado EHC, utilizando para isso diferentes modelos experimentais em camundongos.

Ao utilizar o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético detectamos o potencial antinociceptivo do extrato quando administrado por via intraperitoneal. A contorção abdominal induzida por ácido acético decorre da irritação química na cavidade peritoneal. Este modelo experimental permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (SHINDE; PHADKE, 1999).

Sugere-se que a ação nociceptiva provocada pela administração intraperitoneal de ácido acético ocorra através da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina, envolvidos na modulação da dor (WHITTLE, 1964). Há um indicativo de que as substâncias capazes de inibir a nocicepção causada por esse estímulo possam atuar via inibição destes mediadores químicos.

Diversos extratos e substâncias isoladas de produtos naturais tiveram seus efeitos antinociceptivos detectados pelos testes de contorção abdominal, formalina e placa quente. Viana e colaboradores (2009) identificaram a atividade antinociceptiva do extrato hidroalcolólico obtido das cascas de *Trichilia catigua* A. Juss (Meliaceae), uma espécie nativa do Brasil, conhecida popularmente como catuaba utilizando o modelo de contorção abdominal identificando o envolvimento de receptores dopaminérgicos nas atividades detectadas nesta espécie. Da espécie *Brousonetia papyrifera* (L.) L'Herit. Ex Vent. (BP, Moraceae) foi detectada atividade

antinociceptiva e anti-inflamatória, além da presença de diversos triterpenóides, como ácido ursólico, ácido betulínico e ácido oleanóico (LIN et al., 2008).

Utilizando-se do teste de contorção abdominal por ácido acético, detectamos que o EHC é capaz de reduzir de maneira significativa o número de contorções abdominais a partir da dose de 10 mg/kg, sendo a dose inibitória responsável por reduzir 50% do efeito, de 47 mg/kg. Ainda utilizando esta metodologia, verificamos que o EHC começa a exercer seus efeitos já em 30 minutos após o tratamento, mantendo-se por até 120 min com redução significativa dos efeitos nociceptivos.

Substâncias com potencial sedativo e/ou miorelaxantes mostram-se capazes de interferir na analgesia. Logo, torna-se importante avaliar um potencial efeito deste tipo pelo EHC. Para isso, os animais foram submetidos ao teste de Rota Rod. Neste teste, não foi observado efeito do extrato em alterar a atividade motora, pois os animais que receberam a injeção intraperitoneal do EHC não tiveram sua capacidade de permanecer na barra giratória alterada quando comparado ao grupo tratado com salina.

Diferentes relatos da literatura descrevem o envolvimento de receptores opióides na modulação das ações analgésicas de diversas substâncias e extratos de plantas com potencial farmacológico, sendo a naloxona, um antagonista amplamente utilizado, por bloquear os três subtipos de receptores ( $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ ) envolvidos nesse mecanismo (BACKHOUSE et al., 2008; HESS et al., 2010).

Os receptores opióides estão distribuídos por todo o Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), espalhando-se pela medula espinhal, supra-espinhal e neurônios sensoriais periféricos (KHALEFA et al., 2011). Em episódios inflamatórios os receptores opióides passam a ser expressos em maiores quantidades nas fibras nociceptivas no SNP. A morfina, um analgésico opióide amplamente utilizado na terapêutica atua em receptores  $\mu$ , localizados, principalmente, no tronco cerebral e tálamo. A ligação da morfina a esse receptor provoca a liberação de peptídeos opióides endógenos, como as encefalinas que irão atuar nos receptores  $\delta$  e  $\kappa$ , aumentando o potencial analgésico e efeitos colaterais (VARRASI et al., 2009). Além disso, quando agonistas opióides atuam nos receptores localizados nas fibras pré-sinápticas C e A $\delta$ , podem inibir os canais de  $Ca^{2+}$  voltagem dependente levando a diminuição de AMPc e bloqueio da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e Substância P (McCLEANE; SMITH, 2007).

No entanto, como evidenciado no modelo de contorção abdominal por ácido

acético, o EHC parece exercer seus efeitos antinociceptivos independentes da via de receptores opióides, por não se mostrar capaz de reverter os efeitos antinociceptivos do EHC, quando bloqueados os subtipos de receptores opióides pela naloxona.

O sistema descendente noradrenérgico termina na medula espinhal, onde a noradrenalina (NA) interage com receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. É sabido que a ativação desses receptores na medula espinhal induz a liberação de acetilcolina (ACh) e Óxido Nítrico (NO), que induz analgesia, sugerindo ser o mecanismo pelo qual a clonidina atua como um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico (TANABE et al., 2005; XU et al., 2000). A localização desses receptores na medula espinhal foi largamente estudada e sugerida haver um sinergismo com receptores opióides localizados na medula espinhal. A ativação dos receptores adrenérgicos leva a inibição de nociceptores neuronais (FAIRBANKS, 2001). Assim, outro receptor avaliado foi o adrenérgico por mostrar-se como uma importante via no processo de transmissão da dor. Para isso, os animais foram tratados com ioimbina, um antagonista dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos. Este tratamento não foi capaz de bloquear os efeitos antinociceptivos do extrato, evidenciando que estes receptores não se mostram envolvidos no mecanismo de ação do EHC.

Encontra-se bem estabelecido na literatura científica a participação do óxido nítrico, bem como dos receptores muscarínicos nas vias de percepção de dor (HONDA et al., 2000; JONES; DUNLOP, 2007; SANDERS; MAZE, 2007).

O Óxido nítrico (NO) é uma importante molécula envolvida em processos inflamatórios e dolorosos. O mecanismo através do qual o NO exerce seus efeitos na modulação da dor não foram totalmente elucidados, mas tem sido sugerido que aumento nos níveis de  $Ca^{2+}$  produz ativação da enzima óxido Nítrico Sintase neuronal que aumenta os níveis de NO, que pode agir diretamente nas terminações nervosas livres como neurotransmissor, ou ainda aumentar a liberação de Substância P e de peptídeo relacionado ao gene da calcitonina nas fibras nervosas terminais (CURY et al., 2011; MICLESCU; GORDH, 2009).

Tem sido relatado na literatura que o uso de agonistas de receptores muscarínicos induz analgesia em modelos de experimentação animal, evidenciando o envolvimento desses receptores nas vias de transmissão dolorosa, principalmente dos subtipos  $M_1$  localizados na medula espinhal (BARTOLINI et al., 1987; TAKASU et al., 2006). Dessa forma, a investigação do envolvimento do NO e de receptores muscarínicos mostra-se um interessante mecanismo de ação de substâncias com

potencial analgésico.

Assim, avaliamos a participação destes mecanismos em nosso modelo a fim de detectar sua contribuição no efeito antinociceptivo do EHC. No entanto, tanto o tratamento dos animais com L-NAME quanto com atropina não foram capazes de reverter às ações do extrato, descartando também o envolvimento destas vias de antinocicepção nos efeitos detectados no extrato.

Ainda na busca pela via antinociceptiva induzida pelo EHC, decidimos avaliar o envolvimento dos receptores serotoninérgico (5-HT<sub>3</sub>) e dopaminérgico utilizando o antagonista metoclopramida. Sob este tratamento, os efeitos antinociceptivos induzidos pelo EHC foram parcialmente revertidos indicando a possível via de sinalização por estes receptores. No entanto, para investigar se o efeito observado seria devido à ação serotoninérgica ou dopaminérgica, foi utilizado o antagonista de receptor dopaminérgico, haloperidol, onde o mesmo não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do EHC. Sugerindo assim, que o extrato hexânico das cascas do caule de *C. nemorosa*, exerce seus efeitos antinociceptivos envolvendo a participação de receptores serotoninérgicos. Assim, conhecendo um pouco do mecanismo de transmissão da dor, e do modelo de contorção abdominal por ácido acético, a evidência do envolvimento de receptores serotoninérgicos no mecanismo de ação do extrato, surge como norteador para dar prosseguimento aos estudos.

Agonistas de receptores D<sub>2</sub> dopaminérgicos exercem efeitos antinociceptivos, provocados pelo bloqueio destes receptores na fenda pré-sináptica e a liberação de dopamina endógena, evidenciado pelo antagonista seletivo sulpirida (ZARRINDAST; NASSIRI-RAD; PASOUKI, 1999).

A via serotoninérgica participa de diversos processos patológicos, como depressão, esquizofrenia, fobia social, ansiedade, hipertensão e dor (HOYER; HANNON; MARTIN, 2001; BACKHOUSE et al., 2008). Estes receptores, com exceção do subtipo 5-HT<sub>3</sub> (ligado a canal iônico), são todos acoplados a proteína G e estão presentes no Sistema Nervoso Central e Periférico, além de serem encontrados em outros tecidos não neuronais, como no sistema cardiovascular e no sangue. Os receptores 5-HT<sub>3</sub> são encontrados em neurônios no SNC e SNP, onde provocam rápida despolarização e subsequente abertura de canais iônicos (influxo de Cálcio e efluxo de potássio) na fenda pré-sináptica (HOYER; HANNON; MARTIN, 2001) o que altera o processo de percepção da dor periférica e central, bem como a inflamação (BACKHOUSE et al., 2008). Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> são expressos em

neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos e pós-sinápticos. O bloqueio desse subtipo de receptor provoca antinocicepção por ativação direta dos neurônios pós-sinápticos no SNC que reduz a dor (BARNES e SHARP, 1999; MICO et al., 2006). A presença dos receptores serotoninérgicos em diversas estruturas do SNC e SNP, como o tálamo, fibras aferentes primárias, corno dorsal da medula espinhal realçam a importância dessa via de inibição da dor, suportando a investigação de agonistas desses receptores como potenciais alvos para tratamento da dor (MARTEL et al., 2009).

Bardin e colaboradores (2003) utilizaram o modelo de nocicepção induzida por formalina como modelo de dor tônica aguda para verificar a ação de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

Xie e colaboradores (2008) buscando aprofundar-se nos mecanismos pelos quais o tramadol, um analgésico da classe dos opióides, exerce seus efeitos, mostraram que após tratamento crônico com tramadol há um baixo risco de desenvolvimento de tolerância ao fármaco o que pode ser explicada pelo aumento da analgesia por vias serotoninérgicas, devido sua ação em receptores 5-HT<sub>2A</sub>, que inibe a recaptação neuronal de serotonina e aumenta o efluxo desse neurotransmissor.

A partir de então, com o intuito de avaliar o envolvimento da ação do extrato sobre o SNC, utilizamos o modelo de nocicepção induzida por estímulo térmico. Neste modelo, o estímulo térmico provoca estimulação direta dos nociceptores periféricos e imediata condução do sinal ao SNC, sendo recebida no córtex cerebral e entendida como nociva ao organismo, emitindo o sinal de resposta como retirada imediata da parte do organismo em contato com a fonte agressora (KURASCH et al., 1983). O tratamento dos animais com o EHC não provocou aumento significativo na capacidade dos camundongos em permanecerem na placa aquecida. Assim, verificamos que os efeitos antinociceptivos do extrato parecem não decorrer da interação com mecanismos centrais de nocicepção. Fármacos utilizados na terapêutica com ação sobre o SNC são capazes de aumentar o limiar de percepção da dor, como exemplo da morfina.

Dando prosseguimento aos estudos, investigamos o efeito antinociceptivo do EHC utilizando o teste de nocicepção química induzida por formalina. Este teste permite diferenciar a dor de origem neurogênica (1ª fase), iniciada imediatamente após a aplicação do estímulo, da dor de origem inflamatória (2ª fase), iniciada após

15 minutos da aplicação do estímulo nociceptivo (ABBOTT; FRANKLIN; WESTBROOK, 1995). Neste modelo, a dor provocada na primeira fase (5 minutos iniciais) decorre da ação direta do formaldeído sobre os nociceptores aferentes tipo C e A $\delta$ . Já a dor associada à segunda fase (15 a 30 minutos), ocorre pela estimulação de mediadores pró-inflamatórios. Dessa maneira, esta metodologia mostra-se útil para discriminar substâncias com potenciais analgésicos distintos, visto que substâncias com ação periférica atuam inibindo a segunda fase, enquanto substâncias com ação central mostram-se capazes de inibir ambas as fases deste teste (HUNSKAAR et al., 1987).

Assim, no modelo de nocicepção induzida por formalina o tratamento prévio dos animais com EHC proporcionou uma redução no tempo de latência apenas na fase inflamatória. Estes dados sustentados pela ausência de efeito do extrato no teste da placa quente ganham reforço para propor que os mecanismos determinantes da atividade antinociceptiva do extrato estudado, parecem não envolver mecanismos antinociceptivos centrais. Dessa forma, com este perfil de ação antinociceptiva periférica, o extrato apresenta-se com um bom perfil de ação analgésica, características semelhantes ao fármaco anti-inflamatório não-esteroidal usado como controle, indometacina (FARSAM et al., 2000). A classe de anti-inflamatórios não esteroidais exercem seus efeitos por inibirem a cascata do ácido araquidônico, quer seja atuando na inibição da Fosfolipase A<sub>2</sub> presente na membrana celular ou das enzimas que catalisam a conversão do Ácido araquidônico em prostanóides, tromboxanos e leucotrienos, as enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (BURNETT et al., 2011; BUZZI et al, 2010). Os inibidores de COX são usados no tratamento de diversas patologias, como artrite reumatoide e inflamações provocadas por diversos agentes. No entanto, os pacientes que necessitam fazer uso continuado dessa classe de medicamento, correm riscos de desenvolverem problemas no trato gastrointestinal e eventos cardiovasculares, limitando assim seu uso (PATRIGNANI et al., 2011).

Para confirmar o provável efeito anti-inflamatório do extrato, como evidenciado por sua ação na dor inflamatória do teste de formalina, utilizamos o modelo de edema de pata induzido por carragenina. Neste modelo, o extrato inibiu de maneira significativa o edema de pata nos tempos de 4 h, 24 h e 48 h após o estímulo com carragenina, agindo assim, em tempos mais agudos e tardios do processo inflamatório. Muitos trabalhos descrevem o modelo de edema de pata

como um bom teste para avaliar o potencial anti-inflamatório de substâncias (NONATO et al., 2010). A injeção de carragenina produz um edema em duas fases, que está associado com a produção de vários mediadores, como histamina, bradicinina, NO, prostaglandinas, citocinas (POSADAS et al., 2004). Os momentos iniciais do edema, primeira fase, são caracterizados por um edema de pequena intensidade, com envolvimento de aminas vasoativas, prostanóides e óxido nítrico que aumentam a permeabilidade vascular. A segunda fase do edema, dura até 72 h após a indução com carragenina, e além do envolvimento dos mediadores mencionados, há também um forte infiltrado celular e participação de citocinas (MONCADA e HIGGS, 1991; POSADAS et al., 2004).

De posse dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório evidenciados até o momento, observamos que o EHC (47 mg/kg; i.p.) quando administrado por até 7 dias consecutivos não foi capaz de induzir alterações nos parâmetros comportamentais avaliados, além de não provocar alteração no peso corpóreo do animal, sugerindo não alterar os hábitos alimentares do animal, não alterar a contagem de leucócitos no sangue periférico e nem provocar a morte dos mesmos. Estes dados sugerem que o EHC não provoca efeitos tóxicos sistêmicos perceptíveis.

A realização de ensaios de toxicidade é de suma importância para garantir o uso seguro de plantas medicinais pela população. Mesmo tendo sido realizado um ensaio preliminar, estes resultados indicam que o tratamento por até 7 dias consecutivos com o extrato, não foi capaz de provocar danos evidentes aos animais, assim como não alterou seus hábitos alimentares e comportamentais. Trabalhos descritos na literatura baseiam-se em alguns desses parâmetros para buscar indícios de efeitos tóxicos dos extratos e substâncias estudadas, podendo variar vias de administração e doses utilizadas (NONATO et al., 2010). Estendendo as análises para estudos *in vitro*, o EHC também não apresentou capacidade de interferir na viabilidade celular mesmo quando as células foram expostas ao extrato por um período de 24 horas. O ensaio de viabilidade celular por MTT é bastante utilizado para inferir a ausência de citotoxicidade de extratos e moléculas isoladas (CRUZ et al., 1997; PREETHY et al., 2012; NONATO et al., 2010; PETERSEN et al., 2011). Este ensaio é fundamentado na atividade da mitocôndria, pois apenas células viáveis com intensa atividade mitocondrial são capazes de clivar o sal tetrazolium em cristais de formazan, provocando uma mudança de coloração de amarelo para azul

forte ou roxo, sendo um indicativo colorimétrico para a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Interessados em determinar os constituintes do extrato responsáveis pelas atividades farmacológicas detectadas, estudos analíticos utilizando a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massa (CG-MS) foi empregado. Utilizando uma quimioteca presente no software do equipamento CG-MS houve a possibilidade de identificação dos constituintes químicos da amostra. Neste estudo, identificou-se o triterpeno pentacíclico friedelina como o componente majoritário presente no extrato, e que provavelmente poderia ser o responsável pelas atividades biológicas detectadas.

A classe dos terpenóides é bem distribuída na natureza, sendo encontrada em todas as partes da planta (NIRANJAN et al., 1996, MIURA et al., 1999). Dentre os terpenos há os triterpenóides, compostos de seis unidades de isoprenos, divididos em duas classes principais de compostos tetracíclicos e pentacíclicos. Os terpenóides são bastante estudados quanto a suas propriedades biológicas, onde foi detectados os efeitos hepatoprotetor, analgésico, antimicrobiano, antimicótico, imunomodulador e anti-inflamatório, (DZUBAK et al., 2006). Os efeitos anti-inflamatórios de triterpenos têm sido descritos por sua habilidade em inibir a formação de prostaglandinas, IL-1 $\beta$ , COX-2, importantes mediadores do processo inflamatório (TSAI et al., 2011).

Sabendo que a friedelina mostrou-se como o componente majoritário do extrato, decidimos avaliar os potenciais efeitos biológicos deste triterpenóide. Inicialmente, empregando o teste de formalina, ficou evidenciado que a friedelina possui efeitos antinociceptivos por inibir além da dor inflamatória, a dor neurogênica quando administrado por via intraperitoneal. Além disso, mostrou-se eficiente em inibir a formação do edema na inflamação induzida por carragenina. Entretanto, o perfil de resposta da friedelina diferiu do EHC por inibir o edema em tempos mais tardios. Juntos, esses dados sugerem que além da friedelina, há outros componentes ativos no extrato que podem atuar em sinergismo com a friedelina intensificando seu efeito como evidenciado no modelo de formalina ou modificando seu perfil de ação quando comparado ao grupo tratado com extrato, observado no modelo de edema de pata, onde diferente do EHC, a friedelina foi capaz de inibir a formação do edema apenas em tempos tardios da análise. Tem sido recentemente relatado na literatura que a friedelina isolada do extrato hexânico de *Azima*

*tetracantha* Lam. (Salvadoraceae) apresenta efeitos antinociceptivo, anti-inflamatórios e antipiréticos (ANTONISAMY; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011), além de efeitos citotóxicos em linhagens de células cancerígenas HL-60 (THAO et al., 2010)

De acordo com os resultados obtidos até o momento, ficou evidente que o EHC possui atividades antinociceptiva e anti-inflamatória importantes, sendo a friedelina, seu componente majoritário, a substância que parece responder por parte dos efeitos biológicos avaliados. Então, com propósito de avaliar a estabilidade deste triterpenóide ao ambiente gástrico, observamos que a administração da friedelina por via oral foi capaz de manter seus efeitos antinociceptivos no modelo de formalina, na dor inflamatória. É sabido que a biodisponibilidade de substâncias pode diminuir devido a instabilidade do trato gastrointestinal, dos fluidos presentes e da pobre absorção das substâncias pelo trato gastrointestinal, além de sofrerem reações do metabolismo de primeira passagem (KOFI-TSEKPO, 1994). Dessa forma, a friedelina mostrou-se hábil em reduzir a nocicepção na fase inflamatória causada pela formalina independente da via de administração. Sugerindo mais uma vez que pode haver um sinergismo com outros constituintes presentes no extrato que possam exacerbar o efeito verificado na friedelina. Além disso, o composto isolado, não foi capaz de alterar a viabilidade celular através dos testes *in vitro* de toxicidade celular pelo método de MTT, bem como o extrato de *C. nemorosa*.

Em conjunto, estes resultados sugerem o EHC mostra-se capaz de exercer efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios relevantes, sendo a friedelina, o seu principal constituinte, responsável por estes efeitos. Dessa forma, estudos com a friedelina mostram-se interessantes, para estabelecer suas propriedades biológicas e esclarecer os mecanismos pelos quais exerce tais efeitos.

## 7 CONCLUSÕES

O conjunto dos nossos resultados permite concluir que:

1. O EHC apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético, tendo seus efeitos uma duração de pelo menos duas horas quando injetado por via intraperitoneal. Além disso, seus efeitos parecem depender de vias serotoninérgicas;
2. O EHC não foi capaz de provocar efeitos sedativos e nem alterações na motricidade dos animais quando submetidos ao teste de rota Rod;
3. O EHC parece não envolver mecanismos centrais de nocicepção evidenciado no modelo de placa quente;
4. O EHC apresentou efeito antinociceptivo na fase de dor inflamatória do teste de formalina e efeitos anti-inflamatórios evidenciados no teste de edema de pata induzido por carragenina;
5. Os ensaios prévios de toxicidade evidenciaram que o EHC não induziu alterações no comportamento e na celularidade sanguínea;
6. Ensaios *in vitro* revelaram que o EHC não se mostra possuidor de efeitos citotóxicos;
7. A friedelina foi o constituinte químico encontrado em maior quantidade no extrato, sendo este triterpeno pentacíclico também capaz de provocar efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios.
8. Os efeitos antinociceptivos da friedelina mantiveram-se mesmo quando administrado nos animais por via oral ou intraperitoneal.
9. A friedelina também se mostrou incapaz de gerar citotoxicidade *in vitro*.

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo estabelece as bases para estudos futuros que visam garantir o uso seguro pela população das cascas do caule de *C. nemorosa* para fins analgésicos e anti-inflamatórios. Para isso, estudos que aprofundem os conhecimentos sobre os mecanismos pelos quais o extrato e a friedelina exercem seus efeitos merecem ser investigados.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phase of the pain responses in rats. **Pain**, v. 60, p. 91-102, 1995.
- ANDRADE, M.A. **Constituintes químicos das cascas, folhas e frutos de *Cusia nemorosa* Mey. (Guttiferae)**. Universidade Federal de Alagoas. Dissertação de Mestrado em Química, UFAL, v. 1, p. 3-19, 1997.
- ANDRADE, M.R.; ALMEIDA, E.X.; CONSERVA, L.M. Alkyl chromone and other compounds from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**. v. 47, n. 7, p. 1431-1433, 1998.
- ANTONISAMY, P.; DURAI PANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima tetraacantha* Lam. In mouse and rat models. **Journal Pharm. and Pharmacol.** n. 63, p. 1070-1077, 2011.
- AZEVEDO, M.P. et al. Dor aguda. In: Dor – Cavalcanti, I.L. Maddalena, M.L. Rio de Janeiro: **sociedade de Anestesiologia do estado do Rio de Janeiro**, p. 95-166, 2003.
- BACKHOUSE, N. ET al. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **J. Ethnopharmacol.** V. 119, p. 160-165, 2008.
- BARDIN, L. et al. Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT(1<sup>a</sup>) agonist F13640 in the formalin model of tonic nociceptive pain. **Pharmacol.** v. 67, n. 4, p. 182-194, 2003.
- BARNES, N.M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol.** v. 38, n. 8, p. 1083-1152, 1999.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. B. M. **Química Medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 53 – 58, 2001.
- BARROS, W.R. et al. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H. B. K. stem bark. **An. of the Braz. Academy of Scienc.** v. 82, n. 3, p. 609-616, 2010.
- BARROS, W.M. et al. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K. stem bark. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 82, n. 3, p. 609-616, 2010.
- BARTOLINI, A. et al. Antinociception induced by systemic administration of local anaesthetics depends on a central cholinergic mechanism. **Br. J. Pharmac.** v. 92, p. 711-721, 1987.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting antiinflammatory drugs: critical remarks. **Current Medicinal Chem.** v. 9, p. 1033-1043, 2009.

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

BESSON, J.M.; CAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol Rev.** v. 67, n. 1, p. 167-186, 1987.

BITTAR, M. et al., Antinociceptive activity of 13,118-binaringenin, a biflavonoid presente in plants of the guttiferæ. **Planta Med.** v. 66, n, 1, p. 84-86, 2000.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Ministério da Saude. Decreto 5.813 de 22 de junho de 2006. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/decreto\_5813\_fito.pdf> Acesso em: 26 de ago. 2009.

BRASIL. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Ministério da Saude. Portaria n 971, de 3 de maio de 2006. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>. Acesso em: 5 de set. 2009.

BRASIL. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/** Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.- Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136p: il.- (série C, Projetos, Programas e Relatórios).

BRASIL. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde**. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS n 4.217/2010, em 28 de dezembro de 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Portaria\_MS\_4217\_28\_12\_2010.pdf >. Acesso em: 10 de Nov. 2011.

BOWKER, R.M. et al. Transmitters of the raphe-spinal complex: Immunocytochemical studies. **Peptides**. V. 3, p. 291-298, 1982.

BURNETT, B.P. et al. Flavocoxid inhibits phospholipase A2, peroxidase moieties of the cyclooxygenases (COX), and 5-lipoxygenase, modifies COX-2 gene expression, and acts as an antioxidant. **Mediators of Inflammation**. 2011.

BUZZI, F.C. et al. New antinociceptive agents related to dihydrosphingosine. **Pharmacol. Reports**. v. 62, p. 849-857, 2010.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F., et al Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. Artigo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dos inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev. Bras. Anestesiol.** v. 48, n. 2, p. 137-158, 1998.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Quím Nov**, v. 23. n. 1, 2000.

CHARO, I.F.; RANSOHOFF, R.M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **N. Engl. Med.** n. 354, p. 610-621, 2006.

COLLIER, H.D.J., et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **B J Pharmacol Chemo**, v.32, p. 295, 1968.

COLPAERT, F.C. et al. Large-amplitude 5-HT<sub>1a</sub> receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. **Neuropharmacol.** v. 43, n. 6, p. 945-958, 2002.

CORREA, 1984. In: ANDRADE, M.A. **Constituintes químicos das cascas, folhas e frutos de *Cusia nemorosa* Mey. (Guttiferae)**. Universidade Federal de Alagoas. Dissertação de Mestrado em Química, UFAL, v. 1, p. 3-19, 1997.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2000.

CRUZ, A.J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone form *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. **Phytomedicine**. v. 13, p. 442-445, 2006.

CRUZ T. et. al., Interaction between polyalkylcyanorylate nanoparticles and peritoneal macrophages: MTT metabolism, NBT reduction, and NO production. **Pharmaceutical Research**. V. 14. P. 73-79, 1997.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**. v. 25, p. 243-254, 2011.

Da SILVA et. al., Antinociceptive properties of conocarpan and orientin obtained from *Piper solmsianum* C. DC. var. *solmsianum* (Piperaceae). **J. Nat. Med.** v. 64, p. 402-408, 2010.

DERGANI, A.L.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Quím. Nova na escola**, n. 7, 1998.

DIAS, 1996 In: SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Editora da UFRGS Porto Alegre. 2007.

DICKENSON, A.H. Mechanism of central Hypersensitivity: excitatory amino acid mechanism and their control. In: **The pharmacology of pain** (ed. Dickenson, A. and Besson, J.M.) p. 167-210, Sprong, Berlim, 1997.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S., 1957 In: NONATO et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 $\beta$  inhibition. **Journal of Ethnopharmacol.** 2010.

DZUBAK, P. et al. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Natural Products Reports**. v. 23, p. 394-411, 2006.

EDENS, H.A.; PARKOS, C.A. Neutrophil transendothelial migration and alteration in

vascular permeability: focus on neutrophil-derived azurocidin. [Curr. Opin Hematol.](#) v. 10, n. 1, p. 25-30, 2003.

EL-ALFY, T.S. et al. Isolation of biologically active constituents from *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori. (family: Moringaceae) growing in Egypt. **Pharmacogn. Mag.** v. 26, p. 109-115, 2011.

FAERBER, L. et al., The neuronal 5-HT<sub>3</sub> receptor network after 20 years of research – evolving concepts in management of pain and inflammation. **European Journal of Pharmacol.** v. 560, n. 1, p. 1-8, 2007.

FAIRBANKS, C.A. et al.  $\alpha$ <sub>2c</sub>-Adrenergic receptors mediate spinal analgesia and adrenergic-opioid synergy. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** v. 300, n. 1, p. 282-290, 2002.

FARIAS, J.A.C. et al. Modulation of inflammatory process by leaves extract from *Clusia nemorosa* both *in vitro* and *in vivo* animal models. **Inflammation.** 2011.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DELPHOUR, A.R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **J. Ethnopharmacol.** v. 71, p. 443-447, 2000.

FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.** v. 14, p. 219-245, 1991.

FLOGIO, 2006. In: HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da IV Escola de Verão em Química**, São Carlos, SP, EdUFSCar, p. 152, 2003.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin.** V. 48, n. 2, p. 129-141, 1999.

GILROY, D.W. et al. Inflammatory resolution: new opportunities for drugs discovery. **Drug Discovery, Nature reviews.** v. 3, p. 401-416, 2004.

GONG, J-H. et al. Kaempferol suppress eosinophil infiltration and airway inflammation in airway epithelial cells and mice with allergic asthma. **The Journal of Nutrition.** p. 47-56, 2011.

GUSTAFSON, K.R., et al. The Guttiferones, HIV-inhibitory benzofenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *G. ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron** v.48, p. 10093-10102, 1992.

GUSTEIN, H.B.; AKIL, H. Analgesicos opioides. In: GOODMAN & GILMAN. **As Bases farmacológicas da Terapêutica** / editores responsáveis, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; editor-consultor, Alfred Doodman Gilman; [tradução da 10. ed. Original, Carla de Mello Vorsatz... et al.; revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. – Rio de Janeiro; MacGraw. v.1, ed. 10, p. 333-340, 2003.

HELLER, A. et al. Lipid mediators in inflammatory disorders. **Drugs**. v. 55, n.4, p. 487-496, 1998.

HESS, S. et al. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by myrsinoic acid B. **Biol. Pharm. Bull.** v. 33, n. 2, p 209-215, 2010.

HENRIQUES, M.G. et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunol** 6: 1179-1181, 2005.

HESS, S. et al. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by Myrsinoic Acid B. **Biol. Pharm. Bull.** v. 33, n. 2, p. 209-215, 2010.

HONDA, K. et al. Involvement of M3 muscarinic receptors of the spinal cord in formalin-induced nociception in mice. **Brain Research**. v. 859, p. 38-44, 2000.

HOYER, D.; HANNON, J.P.; MARTIN, G.R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**. V. 71, n. 4, p. 533-554, 2002

HUNSKAAR S.; HOLE K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, p. 103-14, 1987.

IASP. ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL PARA ESTUDOS DA DOR. **Pain**, 1979.  
Disponível em:

<<http://www.iasppain.org/AM/Template.cfm.Section=PAIN&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm%ContentID=7704>>. Acesso em 12 de ago. 2009.

JL,R-R. et al. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? **Trends in neurosciences**. v. 26, n. 12, p. 696-705, 2003

JONES, P.G.; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacol**. v. 53, p. 197-206, 2007

KHALEFA, B. I. et al. Relative contributions of peripheral versus supraspinal or spinal opioid receptors to the antinociception of systemic opioids. **European Journal of Pain**. 2011.

KOFI-TSEKPO, M.W. Optimization of pharmaceutical formulations for therapy. **Afr. J. Health**. v.1, n.1, p. 13-19, 1994.

KUMMER,C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteroides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestesiol**. v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KURASHI Y., et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LEÃO, K.S.A.; KRAYCHETE, D.V. Dor crônica pós-operatória: uma epidemia silenciosa. **Jornal da dor**. v. 39, p.3, 2011.

LEMKE, K.A. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. **Can Vet J**. V. v.45, p. 405-413, 2004.

LIN, L-W. et al. Comparasion with various parts of broussonetia papyrifera as to the antinociceptivo and anti-inflammatory activities in rodents. **Biosc. Biotechnol. Biochem**. v. 72, n. 9, p. 2377-2384, 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**. v. 353, 1999.

MACIEL, M.A.M. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimi. Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

McCLEANE, G.; SMITH, H.S. Opioids for persistent noncancer pain. **Anesthesiology Clin**. v. 25, p. 787-807, 2007.

MARTEI, J-C. et al. 5-HT1A receptors are involved in the effects of xaliproden on G-protein activation, neurotransmitter release and nociception. **British Pharmacol. Society**. v. 158, p. 232-242, 2009.

MCQUAY, H. Opioids in pain management. **Lancet**. V. 353, p. 2229-32, 1999.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbanacea* on the acute inflammatory responses elicited bt LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacol**. v. 151, p. 618-627, 2007.

MELLO, J.G. et al. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. **Evidence-based Complem, and Alternative Med**. p. 1-14, 2011.

MICO, J.A. et al. The role of 5-HT1A receptors in research strategy for extensive pain treatment. **Curr. Top. Med. Chem**. v. 6, n. 18, p. 1997-2003, 2006.

MISCLESU, A.; GORDH, T. Nitric oxide and pain: 'Something old, something new', **Acta Anaesthesiol. Scand**. v. 53, 2009.

MILLAN, M.J.. Descending control of pain. **Prog Neurobiol**. v. 66, p. 355–474, 2002.

MIURA, N. et al. Protective effects of triterpene compounds against the cytotoxicity of cadmium in HepG2 cells. **Molec. Pharmacol**. v. 56, p. 1324-1328, 1999.

MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol**. v. 25, n. 2, 2004.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev**. v. 43, p. 109-142, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric Assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunol. Methods**. v. 65, p. 55-63, 1983.

MURATA, R.R. et al. Antiproliferative effect of benzophenones and their influence on cathepsin activity. **Phytotherapy Research**. v. 24, p. 379-383, 2010.

NADER, M.A; BARAKA, H.N. Effect os betulinic acido n neutrophil recruitment and inflammatory mediator expression. In lipopolysaccharide-induced lung inflammation in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2012.

NIRANJAN, P.S. et al. Triterpenoid saponins from *Gymnema sylvestre*. **Phytochemistry**. v. 41, n. 4, p. 1181-1185, 1996.

NOGUEIRA L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da Evolução da Química Medicinal e a Importância da Lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as Contribuições de Overton e Hansch. **Rev. Virt. de Quím.** v. 1, n.3, 2009.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, D.B.; CECHINEI-FILHO, V. Gênero Calophyllum: importância química e farmacológica. **Quim. Nova**. v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

NONATO et al. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 $\beta$  inhibition. **Journal of Ethnopharmacol.** 2010.

OLIVEIRA, L.F. Farmacologia da dor. In: Dor – Cavalcanti, I.L., Madalena, M.L. Rio de Janeiro, **Sociedade de Anestesiologia do Estado do Rio de Janeiro**, p.37-52, 2003.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em:  
<[http://dtr2004.saude.gov.br/dab/1o\\_seminario\\_internacional\\_pnpic\\_em\\_saude](http://dtr2004.saude.gov.br/dab/1o_seminario_internacional_pnpic_em_saude)>.  
Acesso em: 10 de set. 2009.

PASSOS, G.F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbanaceae*. **Journal of Ethopharmacol.** v.110, p. 323-33, 2007.

PATRIGNANI, P. et al. Managing the adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Expert. Rev. Clin. Pharmacol.** v. 4, n. 5, p. 605-621, 2011.

PETERSEN, S. et al. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on *in vitro* cell viability. **European Journal of Pharmac. And Biopharmceu.** v. 79, p. 150-161, 2011.

PETRENKO, A.B. et al. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: a review. **Anesth. Analg.** v. 97, p. 1108-1116, 2003.

PICCINELLI, A.L. et al. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. **Tetrahedron**. v. 61, p. 8206–8211,

2005.

PINHEIRO, L. et al. Antibacterial xanthenes from *Kielmeyra variabilis* mart. (Clusiaceae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, l. 98, n. 4, Rio de Janeiro, 2003.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacol.** v. 142, p.331-338,2004.

PREENTHY, C.P. et al. Antiproliferative property of n-hexane and chloroform extracts of *Anisomeles malabarica* (L). R. Br. In HPV16-positive human cervical cells. **Journal Pharmacol. Pharmacother.** v. 3, n. 1, p. 26-34, 2012.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

ROCHA, A. P. C., et al. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Rev. Bras. de Anest.** v. 57, n. 1, 2007.

[SANDERS, R.D.](#); [MAZE, M.](#) Adrenergic and cholinergic compounds. **Handb Exp Pharmacol.** V. 177, p. 251-264, 2007.

SANTA-CECILIA, F.V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-epiclusianone, benzophenone from *Garcinia brasiliensis*. **European Journal of Pharmacol.** v. 670, p 280-285, 2011.

SHINDE ,U.A.; PHADKE, A.S. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. Wood oil. **J. Ethnopharmacol**, v. 65, p. 21-27, 1999.

SILVA, J.P. et al., Antinociceptive activity of aqueous extract of *Bowdichia virgilioides* in mice. **J. Med. Food.** v. 13, n.2, p. 348-351, 2010.

SILVA, M.C., FASSA, A.C.G, VALLE, N.C.J. Dor Lombar Crônica em uma População Adulta do Sul do Brasil: Prevalência e Fatores de Risco. **Cad. de Sau. Púb.**, v. 20, n. 2. Rio de Janeiro, 2004.

SIMOES, C.M.O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6 ed. Editora da UFRGS Porto Alegre. p. 75. 2007.

SBED. SOCIEDADE BRASILEIRA PARA ESTUDOS DA DOR. Projeto “**Controle da dor no Brasil**” (Brasil sem dor). Disponível em:<<http://dor.org.br/projetossemdor.asp>> Acesso em: 10 de out. 2009.

SBED. SOCIEDADE BRASILEIRA PARA ESTUDOS DA DOR. **Hospitais sem dor.** Diretrizes para implantação da dor como quinto sinal vital. Disponível em: <<http://www.dor.org.br/5sinalvital.asp>> Acesso em: 16 de ago. 2009.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Neutrophil-derived azurocidin alarms the immune system. **Journal of leukocyte Biol.** v.85, p. 344-352, 2008.

SUFFREDINI, I.B., et al. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plants extracts – Clusiaceae. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.103, p. 287-290, 2006.

TAKASU, K. et al. Spinal  $\alpha$ 2-adrenergic and muscarinic receptors and the NO release cascade mediate supraspinally produced effectiveness of gabapentin at decreasing mechanical hypersensitivity in mice after partial nerve injury. **British journal of Pharmacol.** v. 148, p. 233-244, 2006.

TANABE, M. ET al. Role of descending noradrenergic system and spinal  $\alpha$ 2-adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse. **British J. of Pharmacol.** V. 144, p. 703-714, 2005.

THAO, N.T.P. et al. Triterpenoids from *Camellia japonica* and their cytotoxic activity. **Chem. Pharm. Bull.** v. 58, n. 1, p. 121-124, 2010.

THOMAZZI, S.M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal Ethnopharmacol.** v. 127, p. 451-456, 2010.

TORIGOE, D.Y.; LAURINDO, I.M.M. Artrite reumatóide e doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Reumatol.** v. 46, supl.1, p. 60-66, 2006.

TSAI, J-C. et al. Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and Betulinic acid. **The American Journal of Chinese Medicine.** v. 39, n. 5, p. 943-956, 2011.

UNCHIDA, S. et al. Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procubens* extract and grape seed proanthocyanidins extract in mice. **Biol. Pharm. Bull.** v. 31, p. 240-245, 2008.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H-G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress in Neurobiol.** v. 64, p. 327-363, 2001.

VARRASI, G. et al. Systemic opioid and chronic pain. **European Journal of pain Supplements.** v. 3, p. 77-83, 2009.

VEIGA JÚNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova.** v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERRI JÚNIOR, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol & Therapeutics.** v. 112, p. 116-138, 2006.

VIANA, A.F. et al. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** 2011.

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

VOLKER BITTRICH. Clusiaceae in flora brasiliensis revisitada. Atualizado em 10 de janeiro de 2007. Disponível em: < <http://flora.cria.org.br/taxonCard?id=FBR936> >. Acesso em: 10 de agosto de 2009.

WHITTLE, B.A. Reale of kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **Int. J. Neuropharmacol.**, v. 20, p. 54-60, 1964.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigations**. v. 120, n. 11, 3742-3744, 2010.

XIE, H. et al. Involvement of serotonin 2A receptors in the analgesic effect of tramadol in mono-arthritic rats. **Brain Research**. p. 76-83, 2008.

XU, Z. et al. Role of spinal muscarinic and nicotinic receptors in clonidine-induced nitric oxide release in a rat modelo f neuropathic pain. **Brain Research**. v. 861, p. 390-398, 2000.

YUK, J.E. et al. Effects of lactose- $\beta$ -sitosterol on ovalbumin induced ling inflammation in actively sensitized mice. **Intern. Immunopharmacol.** v. 7, p 1517-1527, 2007.

YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Editora Argos, Chapecó. 528 p. c.1, p. 20-4, 2001.

ZARRINDAST, M.R., NASSIRI-RAD, S., PAZOUKI, M. Effects of dopaminergic agents on antinociception in formalin test. **General Pharmacol.** v. 32, p. 517-522, 1999.