



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

**DIEGO DE FARIAS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
FRAÇÕES DAS FOLHAS DA *Costus cf. arabicus* L. (COSTACEAE)**

Maceió - AL

2013

**DIEGO DE FARIAS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
FRAÇÕES DAS FOLHAS DA *Costus cf. arabicus* L. (COSTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Química Orgânica.

Orientador:

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Coorientador:

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió – AL

2013

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

S586a Silva, Diego de Farias.  
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de frações das folhas da *Costus cf. arabicus* L. (Costaceae) / Diego de Farias Silva. – 2013.  
80 f. : il.

Orientador: Bruno Anderson Matias da Rocha.  
Co-orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 66-78.  
Anexos: f. 79-80.

1. Produtos naturais. 2. *Costus cf. arabicus*. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade anti-inflamatória. I. Título.

CDU: 543.645.9:615.322

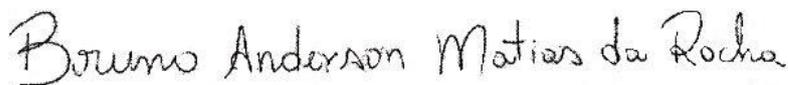
**DIEGO DE FARIAS SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
FRAÇÕES DAS FOLHAS DA *Costus cf. arabicus* L. (COSTACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências com ênfase em Química Orgânica.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC

---

Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto (Examinadora)  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - UFAL

---

Profa. Dra. Sônia Salgueiro Machado (Examinadora)  
Instituto de Química e Biotecnologia – UFAL

*Ao meu pai Adalberon pelo exemplo de homem a ser seguido.*

*À minha mãe, Maria José por toda dedicação e empenho na minha educação.*

*À minha irmã Daniele pelo apoio incondicional e por sempre acreditar no meu potencial.*

*Minha eterna gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço ao nosso pai soberano, Deus, que pela minha fé me dá força e motivos suficientes para romper qualquer barreira que a vida possa interpor pelo caminho.*

*Aos meus familiares que fazem parte da minha vida, da minha história e das minhas conquistas.*

*À Thaysa Torres, meu grande amor, que apesar dos percalços da vida, sempre me acompanhou nos momentos difíceis, me manteve de cabeça erguida e sem a qual não teria alcançado tamanha vitória.*

*Ao meu orientador e amigo, professor Bruno Anderson Matias da Rocha, pela oportunidade oferecida de estar aqui concluindo uma etapa tão importante da minha vida, pela confiança depositada e por todo o conhecimento dedicado ao meu engrandecimento pessoal e profissional.*

*À professora Eliane Aparecida Campesatto, pela importante contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pela solicitude e compreensão que lhe é peculiar, pelo exemplo de profissional e por me honrar com a sua presença na minha banca examinadora.*

*À professora Magna Suzana Alexandre Moreira, por me receber de braços abertos no LaFI, pelas oportunidades concedidas, pelos ensinamentos de vida e por todo apoio intelectual, que com certeza foram essenciais para a realização deste trabalho.*

*Ao professor Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, por acreditar no meu trabalho e aceitar fazer parte dele, como coorientador, disponibilizando seus recursos laboratoriais e intelectuais.*

*À professora Sônia Salgueiro Machado por aceitar fazer parte da banca e pela disposição em contribuir para o aperfeiçoamento desta obra.*

*Aos membros e amigos que adquiri no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI): Aline Cavalcanti, Thays Dias, Walfrido Bispo, Yolanda Cupertino, Carolina da Matta, Morgana Vital, Ana Carolina Vieira, Gabriela Beiriz, Amanda Silva, Ariane Priscilla Magalhães, Mariana Santos, Max Viana, Nívea Karla de Gusmão e Anderson Leite por toda a contribuição dada no desenvolvimento do trabalho, pelo trabalho em equipe, pelos ensinamentos e por todos os momentos de alegria vividos com vocês.*

*Nenhuma forma de agradecimento seria suficiente para demonstrar tamanha gratidão aos meus amigos Luiz Henrique Agra e Maria Alice Falcão por toda disposição, paciência, boa vontade e empenho em contribuir em todas as etapas da realização deste trabalho.*

*Às minhas amigas Isis Torres e Carla Karine Barbosa pela ajuda dada na realização de ensaios químicos e pelos conhecimentos compartilhados neste trabalho.*

*Aos meus amigos Claudener Souza, Raphael Batista e todos os componentes do BioMol-Lab (UFC) por me acolherem tão bem em Fortaleza-CE para o desenvolvimento de parte do trabalho e por todos os conhecimentos compartilhados.*

*Aos meus amigos José Jonathas, Luís Edisnaldo, Rennyer Marinho, Lucas Dias, Thalmanny Goulart, Lívia Rafaela e Erlan Pereira que fizeram parte desta caminhada e também são responsáveis pela minha formação pessoal e profissional, os meus sinceros agradecimentos.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.*

## RESUMO

Os produtos naturais representam uma fonte rica de compostos com atividade farmacológica e são utilizados pela medicina popular no tratamento de diversas doenças como câncer, infecções, dor, inflamação, entre outras. Dentre os produtos naturais, as plantas medicinais têm um lugar de destaque, principalmente no Brasil, onde sua extensa biodiversidade contribui substancialmente para os estudos de novos medicamentos. Nesse contexto, plantas do gênero *Costus*, utilizadas pela medicina popular, têm sido descritas com diversas funções terapêuticas, como anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de frações do extrato metanólico das folhas da espécie *Costus cf. arabicus*, coletada na região do Cariri, município do Crato, no estado do Ceará, Brasil. A metodologia utilizada para o desenvolvimento do estudo se inicia com o processo de extração dos constituintes pelo método de maceração com metanol seguida pelo fracionamento, de acordo com a diferença de polaridade dos solventes, em coluna de sílica, utilizando clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol como eluentes. De posse das frações, a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória foi avaliada utilizando-se os testes de contorção abdominal induzida por ácido acético, teste da placa quente, nocicepção induzida por formalina e peritonite induzida por zymosan. No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, as frações clorofórmica (FCIF), acetato de etila (FAcF) e etanólica (FEF) reduziram o número de contorções em 73,52%, 56,69% e 61,07%, respectivamente. Enquanto no teste da placa quente, evidenciou-se que as frações não tiveram ação antinociceptiva central, pois não conseguiram aumentar o tempo de latência dos animais sobre a placa. No ensaio de nocicepção induzida por formalina, as frações FAcF, FEF e fração metanólica (FMF) apresentaram redução do tempo de lambida da pata em 69,64%, 58,16% e 79,55%, respectivamente, apenas na fase inflamatória. Este resultado corrobora com o encontrado no ensaio de peritonite induzida por zymosan, onde as frações foram capazes de reduzir o recrutamento leucocitário em 61,76% (FCIF), 58,72% (FAcF), 39,17% (FEF) e 64,82% (FMF). Com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que apesar de serem necessários mais estudos para se identificar os mecanismos pelos quais estes compostos agem, as frações da *C. arabicus* que foram testadas apresentam compostos que modulam negativamente os processos álgicos e inflamatórios, justificando, assim, o uso desta espécie na medicina popular.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. *Costus cf. arabicus*. Atividade antinociceptiva. Atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

Natural products are a diverse source of compounds with pharmacological activities, they are normally applied in popular medicine for the treatment of several diseases, such as cancer, infections, pains, and inflammations. Due to the high Brazilian biodiversity, medicinal plants are intensely studied in Brazil aiming the development of new drugs from natural products. In this context, plants from the genus *Costus*, used in popular medicine, have been described with several therapeutic functions, such as anti-inflammatory, analgesic, and antimicrobial activities. The present study aims to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities from the fractions of methanolic extract from leaves of *Costus cf. arabicus*. Plant leaves were collected in the city of Crato, Ceará, Brazil. The compounds were extracted by maceration with methanol followed by fractionation, based in polarity between solvents. The extract was eluted in a silica column using chloroform, ethyl acetate, ethanol and methanol as eluents. The antinociceptive and anti-inflammatory activities were evaluated by the tests of acetic acid-induced writhing, formalin-induced nociception, hot plate test, and peritonitis zymosan-induced. In the test of acetic acid-induced writhing, the chloroformic fraction (FCIF), ethyl acetate (FAcF), and ethanolic (FEF) fractions inhibited the nociception in 73,52%, 56,69% and 61,07%, respectively. However, these fractions did not show any central antinociceptive action when they were tested on hot plate test. On the assay formalin-induced nociception, the fractions FAcF, FEF, and methanolic (FMF) fraction showed a inhibition of nociception in 69,64%, 58,16% and 79,55%, respectively, but just on the inflammatory phase. This result corroborates that what was found in the tests of zymosan-induced peritonitis, in where the fractions inhibited the leucocyte enrollment in 61,76% (FCIF), 58,72% (FAcF), 39,17% (FEF) and 64,82% (FMF). From the results obtained on this study indicate that the *C. arabicus* fractions have compounds showing activity to negative modulate algic and inflammatory processes; justifying the use of *C. arabicus* in popular medicine. However, further studies are necessary to evaluate the mechanisms of action.

**keywords:** Natural products. *Costus cf. arabicus*. Antinociceptive activity. Anti-inflammatory activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transmissão da dor nociceptiva.....	20
Figura 2 – Representação esquemática de um nociceptor. ....	21
Figura 3 – Etapas de percepção da dor. ....	23
Figura 4 – Os cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda da função. .....	24
Figura 5 – Recrutamento leucocitário no processo inflamatório.....	25
Figura 6 – Biossíntese dos eicosanoides a partir do ácido araquidônico. ....	26
Figura 7 – <i>Costus arabicus</i> .....	30
Figura 8 – Etapas do processo de extração.....	35
Figura 9 – Fracionamento do extrato bruto da <i>C. arabicus</i> . A (fase hexânica); B (fase clorofórmica); C (fase acetato de etila); D (fase etanólica); E (fase metanólica). ....	36
Figura 10 – Esquema de um cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada.....	37
Figura 11 – Preparo das frações para ensaios farmacológicos.....	39
Figura 12 – Esquema do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético. .....	41
Figura 13 – Esquema do ensaio de placa quente. ....	42
Figura 14 – Esquema do ensaio de nocicepção induzida por formalina.....	43
Figura 15 – Esquema do ensaio de peritonite induzida por Zymosan.....	44
Figura 16 – Cromatografia em camada delgada das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da <i>C. arabicus</i> . ....	47
Figura 17 – Cromatograma da fração FCIF da <i>C. arabicus</i> .....	48
Figura 18 – Cromatograma da fração FMF da <i>C. arabicus</i> . ....	49

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e dipirona (33 mg/kg, via oral) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....50
- Gráfico 2 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e indometacina (36 mg/kg, via oral) na fase neurogênica do ensaio de nocicepção induzida por formalina. ....52
- Gráfico 3 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e indometacina (36 mg/kg, via oral) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina. ....53
- Gráfico 4 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e da indometacina (36 mg/kg, via oral) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan. ....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Rendimento médio das frações da *C. arabicus* a partir de 3,0 g de extrato bruto. ....46
- Tabela 2 – Efeito antinociceptivo central das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e da morfina (5,7 mg/kg, via intraperitoneal) no ensaio de placa quente. ....51

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AAS</b>	.....	ácido acetil salicílico
<b>AIDS</b>	.....	síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>AINE</b>	.....	anti-inflamatório não esteroidal
<b>AMPc-PKA</b>	.....	monofosfato de adenosina cíclico-proteína quinase A
<b>ASIC</b>	.....	Canais iônicos sensíveis a ácido
<b>C5a</b>	.....	componente do sistema complemento 5ª
<b>CCD</b>	.....	cromatografia em camada delgada
<b>CCK-8</b>	.....	colecistocinina 8
<b>CGRP</b>	.....	peptídeo do gene da calcitonina
<b>CLAE</b>	.....	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CMC</b>	.....	carboximetilcelulose
<b>COX</b>	.....	cicloxygenase
<b>COX-1</b>	.....	cicloxygenase 1
<b>COX-2</b>	.....	cicloxygenase 2
<b>COX-3</b>	.....	cicloxygenase 3
<b>e.p.m</b>	.....	erro padrão da média
<b>FAcF</b>	.....	fração acetato de etila da folha
<b>FCIF</b>	.....	fração clorofórmica da folha
<b>FEF</b>	.....	fração etanólica da folha
<b>FMF</b>	.....	fração metanólica da folha
<b>GABA</b>	.....	ácido gama aminobutírico
<b>GRD</b>	.....	gânglios das raízes dorsais
<b>HETE</b>	.....	ácido hidroieicosatetraenóico
<b>HIV</b>	.....	vírus da imunodeficiência humana
<b>HPETE</b>	.....	ácido hidropoxieicosatetraenóico
<b>HPLC</b>	.....	High Performance Liquid Chromatography
<b>IASP</b>	.....	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>ICAM-1</b>	.....	molécula de adesão intercelular 1
<b>IL</b>	.....	interleucina
<b>IL-1</b>	.....	interleucina 1
<b>IL-10</b>	.....	interleucina 10
<b>IL-1RA</b>	.....	interleucina 1 receptor antagonista

<b>IL-1<math>\beta</math></b> .....	interleucina 1 $\beta$
<b>IL-4</b> .....	interleucina 4
<b>IL-6</b> .....	interleucina 6
<b>IL-8</b> .....	interleucina 8
<b>iNOS</b> .....	óxido nítrico sintase induzida
<b>LOX</b> .....	lipoxigenase
<b>LPS</b> .....	lipopolissacarídeo
<b>LT</b> .....	leucotrienos
<b>LTB<sub>4</sub></b> .....	leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b> .....	leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b> .....	leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b> .....	leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>NGF</b> .....	fator de crescimento do nervo
<b>NO</b> .....	óxido nítrico
<b>PAF</b> .....	fator de ativação plaquetária
<b>PG</b> .....	prostaglandinas
<b>PGD<sub>2</sub></b> .....	prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b> .....	prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2<math>\alpha</math></sub></b> .....	prostaglandina F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b> .....	prostaglandina I <sub>2</sub>
<b>PLA<sub>2</sub></b> .....	fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>R<sub>f</sub></b> .....	fator de retenção
<b>SNC</b> .....	sistema nervoso central
<b>TNF- <math>\alpha</math></b> .....	fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TRP</b> .....	receptor de potencial transitório
<b>TRPV-1</b> .....	receptor de potencial transitório vanilóide 1
<b>TXA<sub>2</sub></b> .....	tromboxano A <sub>2</sub>
<b>VIP</b> .....	peptídeo intestinal vasoativo

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas</b> .....	16
<b>1.2 Dor e nocicepção</b> .....	19
<b>1.3 Inflamação</b> .....	24
<b>1.4 Considerações sobre o gênero <i>Costus</i></b> .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	31
<b>2.1 Geral</b> .....	32
<b>2.2 Específicos</b> .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
<b>3.1 Reagentes, soluções e fármacos-padrão</b> .....	34
<b>3.2 Material botânico</b> .....	34
<b>3.3 Preparo e obtenção das frações da <i>C. arabicus</i></b> .....	34
<b>3.4 Análise cromatográfica</b> .....	37
3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	37
3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das frações FCIF e FMF .	38
<b>3.5 Ensaios farmacológicos</b> .....	39
3.5.1 Preparo das frações e fármacos para ensaios farmacológicos .....	39
3.5.2 Animais .....	39
3.5.3 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	40
3.5.4 Ensaio de placa quente.....	41
3.5.5 Ensaio de nocicepção induzida por formalina .....	42
3.5.6 Ensaio de peritonite induzida por zymosan .....	43
3.5.7 Análise Estatística .....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	45
<b>4.1 Preparo e obtenção das frações da <i>C. arabicus</i></b> .....	46
<b>4.2 Análise cromatográfica</b> .....	47
4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	47
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	48
<b>4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da <i>C. arabicus</i></b> .....	50
4.3.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	50
4.3.2 Ensaio de placa quente.....	51

4.3.3	Ensaio de nocicepção induzida por formalina .....	52
<b>4.4</b>	<b>Efeito anti-inflamatório das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da <i>C. arabicus</i>.....</b>	<b>54</b>
4.4.1	Ensaio de peritonite induzida por zymosan .....	54
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>Extração e fracionamento da <i>C. arabicus</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Análise cromatográfica .....</b>	<b>56</b>
<b>5.3</b>	<b>Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....</b>	<b>56</b>
<b>5.4</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....</b>	<b>57</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da <i>C. arabicus</i>.....</b>	<b>57</b>
5.5.1	Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético .....	57
5.5.2	Ensaio de placa quente .....	59
5.5.3	Ensaio de nocicepção induzida por formalina .....	60
5.5.4	Ensaio de peritonite induzida por zymosan .....	62
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO A – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL. ....</b>	<b>80</b>



## 1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias bioativas

A utilização de produtos naturais pela humanidade vem desde a antiguidade, onde o consumo de ervas e folhas foi considerado uma das primeiras formas de utilização destes produtos (LOMBARDINO; LOWE, 2004). As civilizações Egípcia, Greco-Romana e Chinesa são exemplos na utilização de recursos naturais para o controle de pragas e mecanismos de defesa, como por exemplo, a descoberta do veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) que era utilizado não só para caça, mas também na execução de prisioneiros, como Sócrates, durante o Império Grego (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Como instrumento de cura, as plantas medicinais eram utilizadas, inicialmente, de forma empírica e suas qualidades transmitidas oralmente de geração a geração (BRITTO, 2011). Há vários anos, as plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para pesquisas científicas. Deste esforço, a prática médica beneficiou-se com um novo arsenal terapêutico composto por fitoterápicos e seus derivados, como por exemplo, os fármacos sintetizados a partir de um constituinte de origem natural, como o ácido acetil salicílico (AAS) (SOUSA et al., 2008; LEITE, 2009).

No Brasil, a cultura indígena foi a responsável pela disseminação da medicina natural e até hoje, tanto em regiões mais carentes quanto nos grandes centros urbanos são utilizadas as plantas medicinais (MACIEL et al., 2002). A riqueza da biodiversidade brasileira, com cerca de 20-22% de todas as plantas e micro-organismos existentes na Terra, constitui uma imensa fonte de produtos com utilidade terapêutica (CALIXTO, 2005). Entretanto, o potencial que o Brasil possui para a descoberta de novos fármacos ainda é pouco explorado, ao contrário do que acontece em países como Alemanha, Canadá e Estados Unidos que realizam pesquisas incessantes na área das plantas medicinais (SOUSA et al., 2008).

O avanço na ciência e tecnologia possibilitou o desenvolvimento de vários fármacos, alguns deles de grande importância, que até hoje são utilizados na terapêutica (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Um estudo realizado por Friedrich Wohler, em 1828, demonstrou que através de manipulação química era possível sintetizar um produto orgânico a partir de uma matéria-prima vegetal ou animal (MARCON, 2009). A indústria aperfeiçoou o método do professor F. Wohler e alguns anos mais tarde tornou possível a conjugação de moléculas inorgânicas com

compostos orgânicos, a exemplo da síntese do AAS. O ácido salicílico extraído do salgueiro (*Salix alba*) foi conjugado quimicamente com um grupamento acetato, gerando o AAS, um dos medicamentos mais utilizados no mundo como analgésico e antipirético (LEVESQUE; LAFONT, 2000; LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Destaca-se ainda a contribuição de Alexander Fleming, responsável pela descoberta da penicilina, marco histórico para a indústria farmacêutica, quando detectou, ao acaso, a inibição do crescimento de colônias de *Staphylococcus*, em placas contaminadas por fungos do gênero *Penicillium* (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Fleming observou que esses fungos, produziam uma substância bactericida que ele denominou de penicilina. Posteriormente, Howard Florey e Ernst Chain conseguiram purificar a substância, comprovando os resultados de Fleming. A penicilina ajudou a salvar muitas vidas, sofreu algumas modificações químicas e é um antibiótico até hoje utilizado na clínica (BENTLEY, 2005).

Desde então, a descoberta de produtos naturais com propriedades farmacológicas levou a indústria farmacêutica a desenvolver pesquisas para isolar alguns compostos de grande importância até os dias atuais, como por exemplo, a morfina e a codeína da *Papaver somniferum*, digoxina e digitoxina da *Digitalis* spp., a atropina e a hioscina de espécies da família *Solanaceae* que ainda hoje são muito utilizadas na terapêutica (PHILLIPSON, 2001).

A química medicinal também faz uso dos recursos naturais no desenvolvimento de novas moléculas ou modificações estruturais com a finalidade de potencializar ou modificar seus efeitos (HARVEY, 2008; BARREIRO, 2009). Uma das ferramentas utilizadas pela química medicinal para modificação estrutural moléculas é o bioisosterismo, estratégia racional de modificação molecular de um composto protótipo com a finalidade de melhorar a estrutura e características moleculares, tais como: melhorar afinidade, eficácia e especificidade da molécula, reduzir efeitos tóxicos, modificar características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas (LIMA; BARREIRO, 2005).

O AAS foi pioneiro na área de química medicinal, seguido por outras moléculas não menos importantes, como por exemplo, os barbitúricos (fármacos antiepilépticos e anestésicos), epinefrina (broncodilatador e descongestionante nasal), procaína e benzocaína (anestésicos locais). Motivada pela necessidade na melhoria dos tratamentos de infecções, alergias, dor e distúrbios no sistema nervoso central (SNC), a pesquisa relacionada à estrutura química, e planejamento racional

de moléculas bioativas ganhou força durante e logo após a II Guerra Mundial. Foi nessa época que foram descobertas substâncias como a sulfonamida (antimicrobiano), clorpromazina (antipsicótico), imipramina (antidepressivo) e indometacina que constitui um importante fármaco anti-inflamatório não esteroidal (AINE) (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Um grande número de substâncias de origem natural com atividade farmacológica tem sido relatado, com destaque para os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, tais como: alcaloides, terpenoides, flavonoides que são objetos de vários estudos e alguns já apresentam resultados que evidenciam a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (CALIXTO et al., 2000).

Dentre algumas espécies de plantas estudadas, encontram-se as do gênero *Aloe* possuem cada vez mais trabalhos que descrevem sua atividade cicatrizante e antimicrobiana, mas além dessas já existem estudos que demonstram a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Aloe saponaria* em ratos (SILVA et al., 2013). Todas as partes que constituem as plantas podem ser utilizadas em pesquisas de substâncias ativas, inclusive os frutos, que é o caso da pesquisa realizada com carotenoides extraídos da pimenta (*Capsicum annum*), que apresentaram resultados bastante promissores como substâncias antioxidantes, antinociceptiva e anti-inflamatórias (ORTEGA et al., 2012). Os óleos essenciais também são alvos de constantes descobertas, como o óleo essencial da *Croton adamantinus*, uma planta utilizada pela medicina popular no nordeste brasileiro que apresentou em seus resultados ação antinociceptiva e cicatrizante, condizente com as informações trazidas pelo conhecimento popular (XIMENES et al., 2013).

O ambiente marinho também constitui um imenso reservatório de compostos bioativos e isso pode ser ilustrado pela demonstração da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico da alga *Bryothamnion triquetrum* em modelos animais, confirmando a presença de metabólitos capazes de modular os processos nociceptivos e inflamatórios (CAVALCANTE-SILVA et al., 2012). Outro trabalho com algas marinhas avaliou a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de diversas frações de algas do gênero *Caulerpa*, demonstrando em seus resultados que os metabólitos presentes nas espécies estudadas possuem propriedades farmacológicas capazes de atenuar os processos álgicos e inflamatórios em modelos animais (DA MATTA et al., 2011). Além das espécies vegetais, produtos de origem animal também são objetos de estudos na área de dor e inflamação. É o

caso da cobra *Dendroaspis polylepis*, onde estudos demonstram que toxinas polipeptídicas presentes no seu veneno, têm ação analgésica semelhante à morfina e inibem a dor tanto a nível central quanto periférico pelo bloqueio de canais iônicos sensíveis a ácido (ASIC) (DIOCHOT et al., 2012).

Apesar dos progressos no desenvolvimento da terapia, a medicina ainda tem grande necessidade por medicamentos analgésicos mais potentes e eficazes, especialmente para o tratamento de pacientes com dor crônica, os quais dependem de analgésicos opioides (CALIXTO et al., 2000).

## 1.2 Dor e nocicepção

A dor é um mecanismo de proteção, sendo considerada uma experiência indesejável, física ou emocional de caráter subjetivo, ligada a memórias emocionais, fatores patológicos, genéticos e cognitivos (NOEL et al., 2012; ROY et al., 2009). A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define dor como sendo "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano" (TRACEY; MANTYH, 2007). A dor fornece um rápido aviso ao sistema nervoso para iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico (FEIN, 2012).

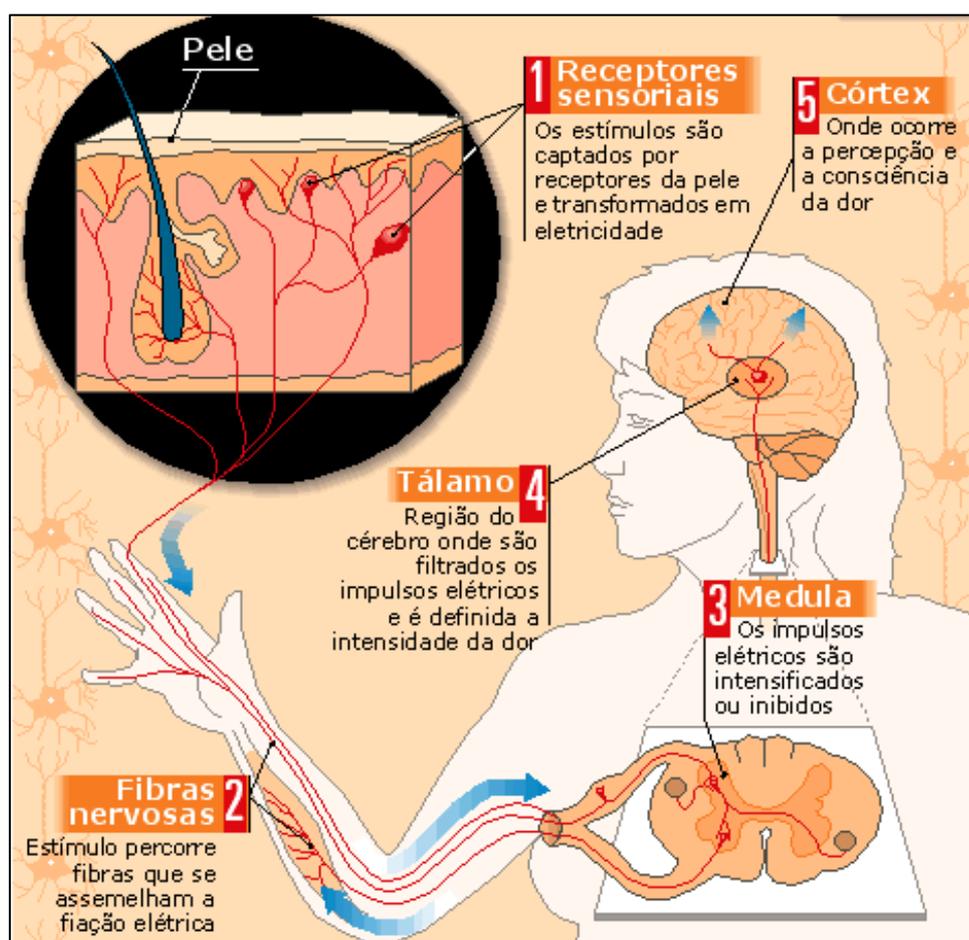
Sendo uma condição extremamente subjetiva, é bastante complicado mensurar e classificar os diversos tipos de dor. Um critério bastante utilizado é o temporal, ou seja, a duração da dor em um espaço de tempo. Segundo esse critério, a dor é classificada em transitória, aguda e crônica (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2006). A dor transitória tem a função de proteger o organismo contra uma possível lesão dos tecidos, ou seja, ocorre sem que haja danos teciduais. Já na dor aguda, ocorre uma lesão tecidual que antecede a sensação dolorosa, podendo ser ocasionada por diversos tipos de lesões como escoriações e processos cirúrgicos. Em ambos os tipos, a dor ocorre por determinado período de tempo e servem para alertar uma alteração na homeostase do organismo (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

Quando o organismo não é capaz de solucionar a causa que deu origem a sensação dolorosa, e esta se prolonga no tempo (meses ou anos), estamos nos referindo à dor crônica (McCURDY; SCULLY, 2005). São várias as causas que podem originá-la, o que torna ainda mais complexo o diagnóstico e o tratamento.

Esse tipo de dor causa intenso sofrimento, incapacita o indivíduo a desenvolver suas atividades normais, além de diminuir a qualidade de vida, pois podem se associar a outras patologias, como por exemplo, a depressão (TRACEY; DICKENSON, 2012).

Outro critério utilizado para classificar a dor é quanto a sua origem, que pode ser definida como nociceptiva, inflamatória e neuropática. A dor nociceptiva corresponde a uma resposta fisiológica do SNC e periférico a uma lesão tecidual (superficial ou mais profunda) localizada (SALTER, 2005). Enquanto na dor inflamatória, a ocorrência de uma lesão tecidual leva à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam/ativam os neurônios periféricos, induzindo, assim, uma resposta nociceptiva que desencadeará a dor. Esses mediadores são liberados tanto por uma lesão tecidual quanto pela presença de algum corpo estranho no organismo (Figura 1) (CUNHA, 2009).

**Figura 1 – Transmissão da dor nociceptiva.**



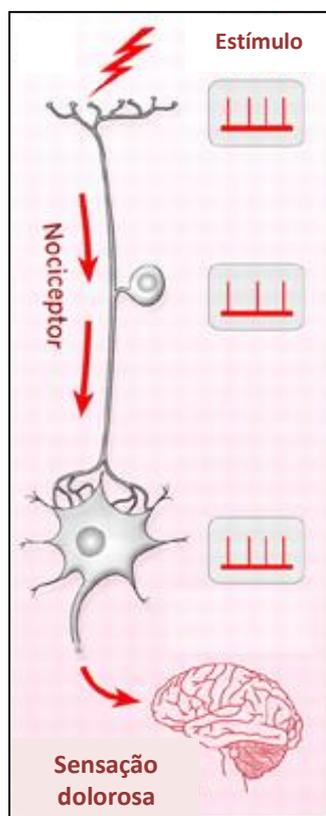
Fonte: FERNANDES, 2012.

Quando uma lesão afeta diretamente o sistema nervoso (somatosensorial) a dor produzida é a neuropática (TREEDE et al., 2008). As causas são diversas e podem ser periféricas ou centrais como: traumas mecânicos, alcoolismo, diabetes, infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), terapia medicamentosa crônica de algumas doenças, como câncer e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SCADDING, 2003).

O sistema nociceptivo é o responsável pela geração e modulação do estímulo doloroso que ocorre a partir da transmissão de sinais que informam alguma lesão tecidual e resposta na forma de dor. Sendo assim, a nocicepção corresponde a manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008).

Os neurônios especializados para a transmissão da dor (nociceptores) encontram-se amplamente distribuídos e servem de alerta para um possível dano ao organismo, através da detecção de condições extremas de temperatura, pressão e produtos químicos prejudiciais (Figura 2) (TRACEY; DICKENSON, 2012).

**Figura 2 – Representação esquemática de um nociceptor.**



Fonte: Adaptado de FLOR, 2002.

Existem duas classes principais de nociceptores, que são as fibras aferentes mielinizadas ( $A\delta$  - que conduzem mais rapidamente o impulso nervoso;  $A\beta$  - que respondem a estímulos mecânicos inócuos) e as aferentes não-mielinizadas (fibras C polimodais - de baixa condutância) (BASBAUM et al., 2009). Esses nociceptores são encontrados na pele, musculatura esquelética, articulações, vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Aqueles nociceptores que inervam o corpo possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRD), enquanto os que inervam a face estão localizados no gânglio trigeminal (MEYER, 2008).

As fibras nervosas aferentes primárias são as responsáveis por detectar estímulos ambientais térmicos, mecânicos ou químicos e transduzir essas informações em corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Os receptores de potencial transitório (TRP) constituem o maior grupo de detectores de estímulo nocivos (CHENG; JI, 2008; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009). Um desses receptores, conhecido o receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV-1), foi descrito como receptor polimodal, ativado por estímulos térmicos ( $> 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), baixo pH ( $< 5,9$ ) e por compostos vanilóides (capsaicina) (CATERINA; JULIUS, 2001; TOMINAGA, 2007).

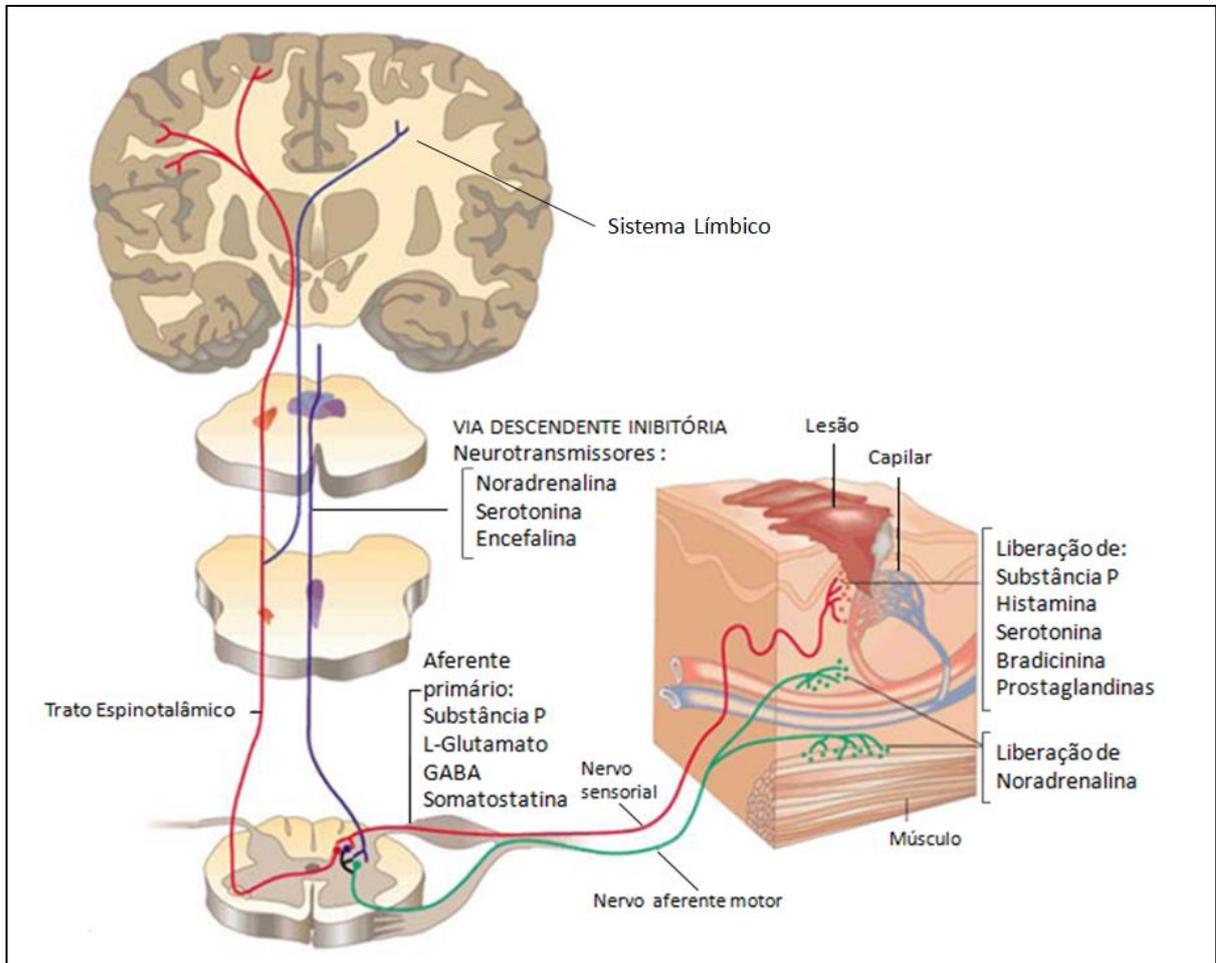
Outrossim, os ASIC, que são ativados por prótons extracelulares e sua expressão pode ser estimulada por mediadores inflamatórios (fator de crescimento do nervo - NGF, serotonina, interleucina 1 - IL-1 e bradicinina) também desempenha um papel importante na dor, principalmente quando sua origem é inflamatória (MAMET et al., 2002; VOILLEY et al., 2001).

Os mediadores inflamatórios que participam no processo de ativação dos nociceptores são a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos (LT), fator de ativação plaquetária (PAF), prostaglandinas (PG), tromboxanos, interleucinas (IL), fator de necrose tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ), fator de crescimento neuronal (NGF) e serina proteases (VERGNOLLE, 2008).

Na ocorrência de uma lesão tecidual e conseqüente liberação e interação dos mediadores químicos locais com seus respectivos receptores, é desencadeado um processo de transmissão do estímulo doloroso até alcançarem níveis centrais (MARCON, 2009). Após essa sensibilização dos nociceptores periféricos e geração dos potenciais de ação, são liberados vários neurotransmissores, tais como: substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina 8 (CCK-8), somatostatina e peptídeo do gene da

calcitonina (CGRP) no corno dorsal da medula espinhal (Figura 3) (DA MATTA, 2012).

**Figura 3 – Etapas de percepção da dor.**



Fonte: DA MATTA, 2012.

Os neurônios de segunda ordem são, então, ativados pelos neurotransmissores e o sinal segue para as áreas do sistema límbico (tálamo) e córtex cerebral pelo trato espinotalâmico, que compreendem as regiões finais da via nociceptiva. Chegando ao tálamo, o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, enquanto no córtex existe o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2009).

### 1.3 Inflamação

O processo inflamatório consiste na resposta a lesões teciduais diversas (física, química ou biológica) acompanhadas pela liberação de uma série de mediadores com o objetivo de eliminar do organismo o agente nocivo (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Os sinais característicos da inflamação são a dor, o calor, o rubor, o edema. Além desses sinais característicos, pode ocorrer ainda a perda da função, que é o 5º sinal da inflamação (Figura 4) (ALLER et al., 2007; SERHAN; SAVIL, 2005).

**Figura 4 – Os cinco sinais da inflamação: calor, rubor, tumor, dor e perda da função.**



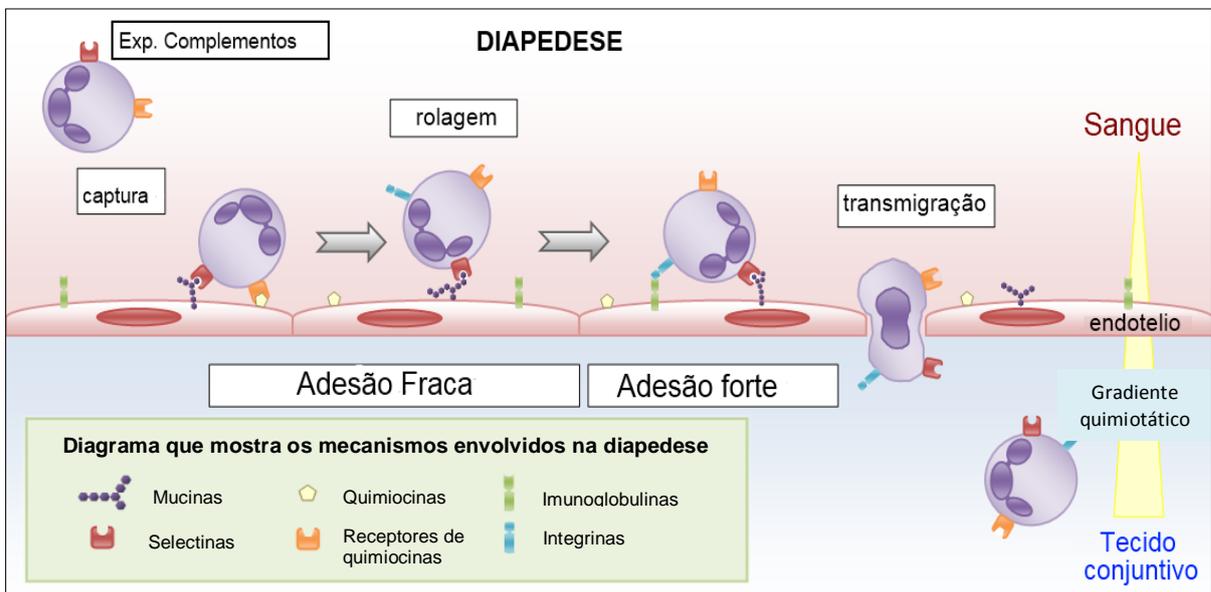
Fonte: DA MATTA, 2012.

Na fase inicial da inflamação, observam-se os sinais do calor e rubor que ocorrem devido a uma vasodilatação periférica e aumento do fluxo sanguíneo. Tais eventos vasculares são mediados principalmente por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PG) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; VERGNOLLE, 2008). A formação do edema, ou seja, do extravasamento do exsudato, acontece devido à liberação simultânea de mediadores como a histamina, bradicinina, PAF e LT que aumentam a pressão oncótica e a permeabilidade vascular, fazendo com que os

fluidos proteicos (exsudato) passem para o espaço extracelular (GILROY et al., 2004).

Após a fase marcada por eventos vasculares ocorre a fase celular, marcada pela transmigração de leucócitos ao longo de um gradiente químico até o local lesionado (MEDZHITOV, 2008). Esse processo, decorrente de estímulos quimiotáticos, é denominado quimiotaxia e compreendem as etapas de marginação (movimentação do neutrófilo do centro para a periferia do vaso), rolagem (desaceleração do neutrófilo através da ligação com moléculas de adesão chamadas selectinas), aderência às paredes endoteliais e migração dos leucócitos até o local do tecido lesionado (o neutrófilo atravessa o endotélio através de interações entre as células) (Figura 5) (MARSHALL et al., 2003). Quando o agente nocivo não é eliminado pelo processo inflamatório agudo, desenvolve-se a fase proliferativa (crônica) da inflamação. Consiste em um processo de longa duração (variando de semanas até anos) que envolve degeneração e fibrose tecidual, exsudato rico em linfócitos e macrófagos (MONTENEGRO; FECHIO, 2010).

**Figura 5 – Recrutamento leucocitário no processo inflamatório.**

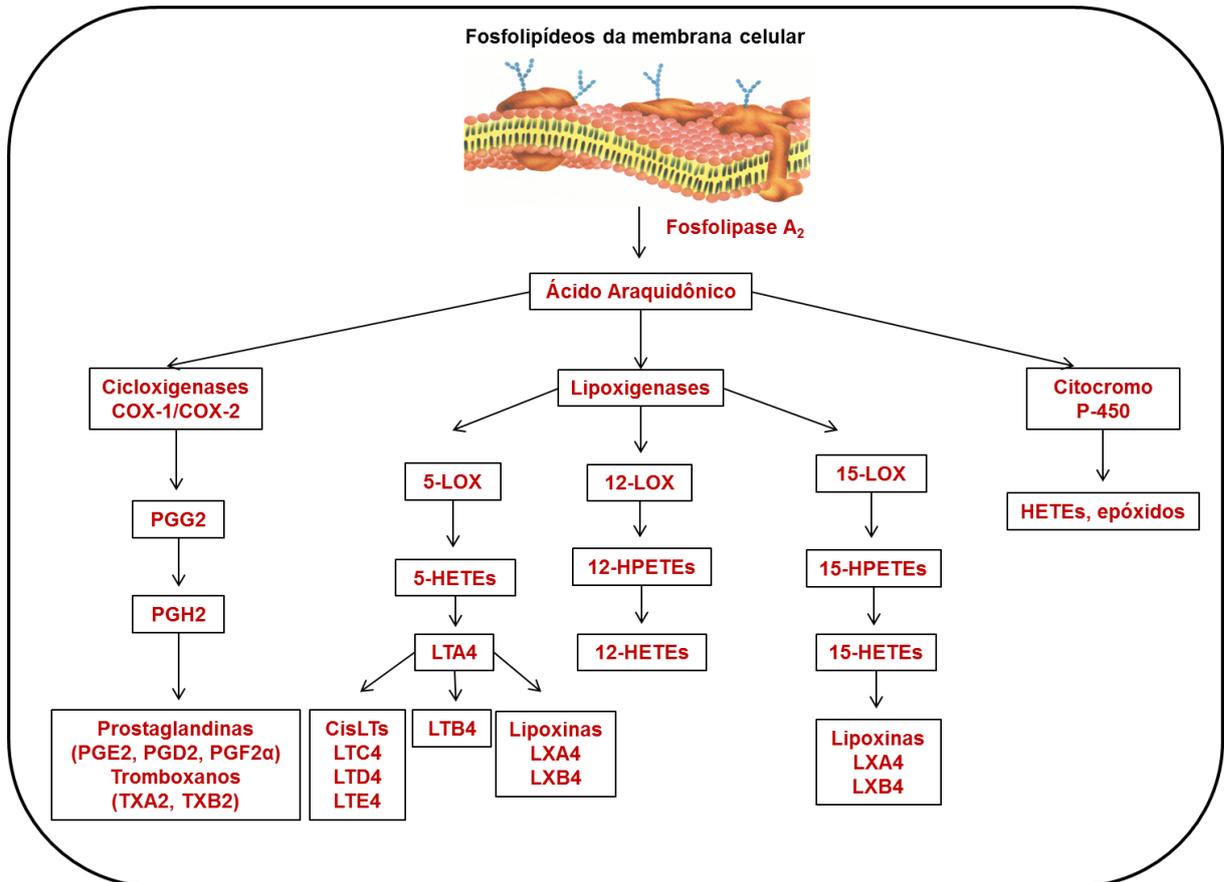


Fonte: Adaptado de CUNHA, 2011.

Existem inúmeros agentes que promovem a quimiotaxia, sendo os principais os componentes do sistema complemento (C5a), produtos da via da lipoxigenase (leucotrieno B<sub>4</sub> – LTB<sub>4</sub>), fator de ativação plaquetária (PAF), quimiocinas e endotoxinas de origem bacteriana (lipopolissacarídeo – LPS) (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Quando os fosfolípidos de membrana sofrem estímulos mecânicos, químicos ou físicos liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado pelas cicloxigenases (COX) produzindo os prostanoídeos (prostaglandinas e tromboxanos) e pelas lipoxigenases (LOX) produzindo leucotrienos (Figura 6) (BOTTING, 2006).

**Figura 6 – Biossíntese dos eicosanóides a partir do ácido araquidônico.**



Fonte: Adaptado de, CAVALCANTE-SILVA, 2010.

São conhecidas três isoformas da enzima cicloxigenase, a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é uma enzima constitutiva, presente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, sendo responsáveis por funções fisiológicas. A COX-2 é induzida por alguns mediadores como IL-1 e TNF- $\alpha$  e é a enzima envolvida nos processos inflamatórios por produzir os prostanoídes (prostaglandinas e leucotrienos). A COX-3 é descrita como uma isoforma encontrada principalmente no SNC, principalmente região do córtex cerebral, medula, e também expressa no coração (CHANDRASEKHARAN; DAI; ROOS, 2002; HIKIJI et al., 2008).

As prostaglandinas envolvidas na inflamação são: PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) e TXA<sub>2</sub>. A PGI<sub>2</sub> age como vasodilatadora, mas também age potencializando os efeitos quimiotáticos e aumentando a permeabilidade vascular para que outros mediadores desempenhem seus papéis no local da inflamação. As prostaglandinas PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> e PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  também possuem ação vasoativa e estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular e formação do edema. Além disso, as PG também participam dos processos dolorosos e febris durante a inflamação, é o caso da PGE<sub>2</sub>, que torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos (PECCHI et al., 2009).

Os leucotrienos (LT) são produtos derivados do ácido araquidônico, a partir do grupo de enzimas chamadas de lipoxigenases, que são enzimas citosólicas, solúveis, encontradas preferencialmente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSHI et al., 2007). Dentre os LT, o LTB<sub>4</sub> exerce um papel importante no processo que quimiotaxia de várias células (neutrófilos, eosinófilos e monócitos), promovendo a migração das mesmas para o tecido lesionado. Outra função exercida pelos LT é a ativação dos leucócitos e promoção da degranulação, além de produzirem superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Outros LT, como LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, atuam aumentando a permeabilidade vascular (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; WIENECKE, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, derivado do metabolismo do aminoácido L-arginina que sofre ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzida pela ativação de leucócitos em condições inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001). O NO promove o relaxamento vascular, além de inibir o processo de agregação plaquetária e adesão leucocitária, também está envolvido na neurotransmissão e na atividade antimicrobiana e antitumoral dos macrófagos

(ZOCCALI, 2007). Participam no processo inflamatório gerando efeitos negativos pela ação citotóxica que alguns de seus metabólitos podem exercer sobre o DNA, lipídeos de microrganismos e células vizinhas saudáveis (SZABÓ, 2003).

Mastócitos e basófilos, células que sofrem degranulação, produzem e liberam outros mediador importante no processo inflamatório, a histamina. Ela provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sendo os pulmões, a pele e o trato gastrointestinal os locais onde se encontra uma maior concentração (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008). A histamina exerce sua ação quando interage com seus receptores específicos ( $H_1$ ,  $H_2$ ,  $H_3$  e  $H_4$ ). A ativação dos receptores  $H_1$  resulta numa vasodilatação de início rápido e de curta duração, além de aumentar a permeabilidade vascular, enquanto a ativação dos receptores  $H_2$  causa uma vasodilatação mais prolongada e de início lento, via do monofosfato cíclico de adenosina/proteína quinase A (AMPc-PKA) (LEURS; WANTANABE; TIMMERMAN, 2001). A interação entre a histamina e os receptores  $H_1$  aumenta a expressão de P-selectina nas células endoteliais (promovem a adesão neutrofílica) (GABOURY et al., 1995). Os receptores  $H_3$  são autorreceptores em neurônios histaminérgicos, que inibem a liberação de uma variedade de neurotransmissores. Já os receptores  $H_4$  parecem estar envolvidos com quimiotaxia e expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) em eosinófilos (LING et al., 2004). Assim como a histamina, outro mediador que possui ação vasoativa é a bradicinina, um peptídeo que provoca vasodilatação (resultante da produção de  $PGI_2$  e liberação de NO) seguida pelo aumento da permeabilidade vascular, além de representar um modulador de estímulos dolorosos (decorrentes da liberação de PG) (LEEB-LUNDBERG, 2005).

As citocinas mediadoras da resposta inflamatória liberadas por uma variedade de células (macrófagos, neutrófilos e células endoteliais) e produzem diversos efeitos, como por exemplo, ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular, além de participarem do processo inflamatório, da imunidade e do reparo de tecidos lesados (PECCHI et al., 2009; HANADA; YOSHIMURA, 2002). As IL, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia, fazem parte do grande grupo das citocinas. Também é possível classificar as citocinas, de acordo com a sua função no processo inflamatório, em citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4 e IL-10) (WONG; FISH, 2003). A IL-8, por exemplo, atua como fator quimiotático, atraindo células

polimorfonucleares para a o local da inflamação. Estão também, envolvidas nesse processo, as quimiocinas, que são fundamentais para os leucócitos, pois atuam em seu crescimento, diferenciação e ativação, imprescindíveis para que ocorra quimiotaxia (TOWNSEND; MCKENZIE, 2000). Outros fatores, tais como, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , são capazes de aumentar a excitabilidade dos receptores neuronais, modulando o processo algico, bem como, aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (STELLWAGEN; MALENKA, 2006).

É crescente o número de pesquisadores interessados em estudar os mediadores e a fisiopatologia da inflamação, pois apesar de já existirem várias alternativas farmacológicas para o tratamento, o arsenal é deficiente porque alguns medicamentos apresentam uma eficácia limitada e outros possuem efeitos adversos que restringem sua utilização (GRIS et al., 2010). Um exemplo clássico é o mecanismo pelo qual agem os anti-inflamatórios, que ao inibir a síntese de PG podem causar lesões gástricas, já que as prostaglandinas também estão envolvidas na produção de muco que reveste e protege as paredes estomacais. Sendo assim, é necessário que as pesquisas continuem na busca por alternativas mais eficazes no tratamento da inflamação (VERGNOLLE, 2008).

#### **1.4 Considerações sobre o gênero *Costus***

O gênero *Costus* é o maior dentre os pertencentes à família *Costaceae*, com 125-175 espécies de distribuição pantropical, mas a maioria de suas espécies ocorre nos Neotrópicos (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2007). A maioria das espécies se desenvolve em ambientes quente e úmido, como as bordas das florestas e locais onde existem correntes de água (SALINAS, CLAVIJO, BETANCUR, 2007).

A *Costus arabicus* (*Costaceae*) é uma espécie herbácea, nativa de mata, conhecida popularmente como canarana, canela-de-ema, cana-do-brejo, cana-de-macaco e gengibre-espiral (COSTA et al., 2012) (Figura 7). Esta espécie é comumente utilizada como planta ornamental e na medicina popular no tratamento de diversas doenças, como por exemplo, infecções no trato urinário, pedras nos rins, controle da diabetes, artrite, assim como no tratamento da dor e de processos inflamatórios, que é o foco do presente estudo (CUNHA et al., 2011).

**Figura 7 – *Costus arabicus*.**



Fonte: MAAS; KAMER, 2009.

Outras espécies desse gênero, como é o caso da *Costus spiralis*, e da *Costus speciosus* que também são utilizadas na medicina popular por possuírem algumas propriedades farmacológicas importantes no tratamento da dor e da inflamação (ARAÚJO, 2010; MEDEIROS; FONSECA; ANDREATA, 2004).

Em uma revisão sobre a espécie *C. speciosus* várias propriedades farmacológicas são observadas na medicina popular, entre elas a ação anti-inflamatória a partir da infusão ou decocção de suas folhas (SRIVASTAVA et al., 2011). Outro trabalho demonstrou a ação anti-inflamatória na fração clorofórmica da *Costus afer* que reduziu significativamente o edema de orelha, sugerindo que nesta fração existem metabólitos secundários responsáveis pela ação farmacológica (MOODY & OKWAGBE, 2003). Ainda sobre a atividade anti-inflamatória presente no gênero, foi realizado um estudo a partir das folhas da *Costus spicatus* de onde foram isolados e descritos alguns glicosídeos flavônicos que demonstraram inibição na produção de óxido nítrico em macrófagos ativados, bem como atividade anti-inflamatória (SILVA; BERNARDO, PARENTE, 2000).



## 2.1 Geral

Determinar as propriedades farmacológicas de frações obtidas a partir de um estudo fitoquímico da espécie *C. arabicus* visando novas alternativas terapêuticas para o tratamento dos processos álgicos/inflamatórios.

## 2.2 Específicos

- Obter o extrato metanólico bruto da *C. arabicus* pelo método de maceração;
- Fracionar o extrato bruto da *C. arabicus* por polaridade em cromatografia líquida;
- Determinar o perfil cromatográfico das frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica e metanólica por Cromatografia em Camada Delgada;
- Determinar o perfil cromatográfico das frações clorofórmica e metanólica por Cromatografia líquida e Alta Eficiência.
- Analisar a atividade antinociceptiva das frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica e metanólica nos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina;
- Investigar possível ação central das frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica e metanólica em modelo de placa quente;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória das frações clorofórmica, acetato de etila, etanólica e metanólica em modelo animal de inflamação aguda de peritonite induzida por Zymosan.



### 3.1 Reagentes, soluções e fármacos-padrão

Na etapa de extração e fracionamento, foram utilizados os seguintes solventes: hexano P. A., clorofórmio P. A., acetato de etila P. A., etanol P. A., metanol P. A., todos da marca Vetec.

Nos ensaios farmacológicos foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: ácido acético P.A. e formaldeído P.A. (Vetec); azul de tripan, cloreto de sódio (NaCl), carboximetilcelulose (CMC), Zymosan e tween 80<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich).

Além disso, os seguintes fármacos foram utilizados como padrão: Dipirona (Sigma-Aldrich), Indometacina (Merck) e Morfina (Cristália, BR).

### 3.2 Material botânico

As folhas da *C. arabicus* foram coletadas no município do Crato (região do cariri, estado do Ceará, Brasil), no ano de 2012 e a identificação botânica foi realizada no Herbário Prisco Bezerra (Universidade Federal do Ceará), onde a exsicata foi depositada sob o número 044500.

### 3.3 Preparo e obtenção das frações da *C. arabicus*

Todos os procedimentos de extração e fracionamento foram realizados no BioMol-Lab (Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas – Universidade Federal do Ceará) sob orientação do professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha no ano de 2012.

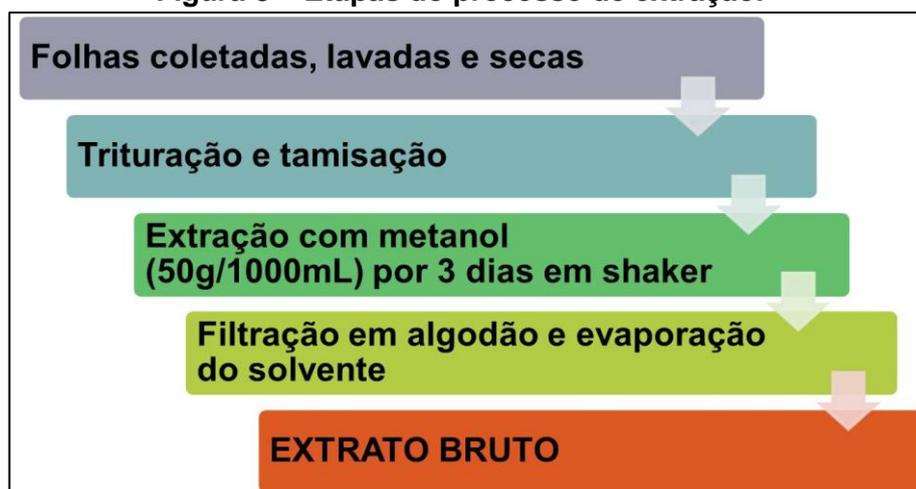
Inicialmente, as folhas da *C. arabicus* foram coletadas, lavadas com água destilada e passaram pelo processo de secagem à temperatura ambiente (~25 °C). Já com o material seco, o segundo passo foi triturar as folhas (tritador) e tamisar o material para separar as partículas de menor grau de divisão.

Após a obtenção do pó, iniciou-se o processo de extração a frio, utilizando metanol (na proporção de 50 g de material vegetal para 1000 mL de solvente em um erlenmeyer) e um agitador do tipo Shaker. A agitação perdurou por um período de três dias, sendo interrompida diariamente para uma agitação manual vigorosa por alguns minutos.

Feita a extração, a amostra foi filtrada em algodão com o auxílio de um funil de vidro para separar o extrato da matéria orgânica que foi acondicionado em recipiente de vidro âmbar.

A amostra foi concentrada pela evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador com uma temperatura controlada, inferior a 50 °C, até que o solvente evaporasse quase por completo. O extrato concentrado foi colocado em uma placa de petri (previamente pesada) onde teve o restante de solvente evaporado utilizando-se um banho-maria, também com temperatura inferior a 50 °C e por tempo necessário à completa evaporação. Foi observado que o rendimento aproximado da extração gira em torno 6% (3 g de extrato metanólico bruto a cada 50 g de material vegetal) (Figura 8).

**Figura 8 – Etapas do processo de extração.**



Fonte: Autor, 2013.

O fracionamento do extrato foi realizado através de uma coluna de vidro, com sílica gel (SiO<sub>2</sub>) como fase estacionária e solventes de diferentes polaridades como fase móvel, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol (Figura 9).

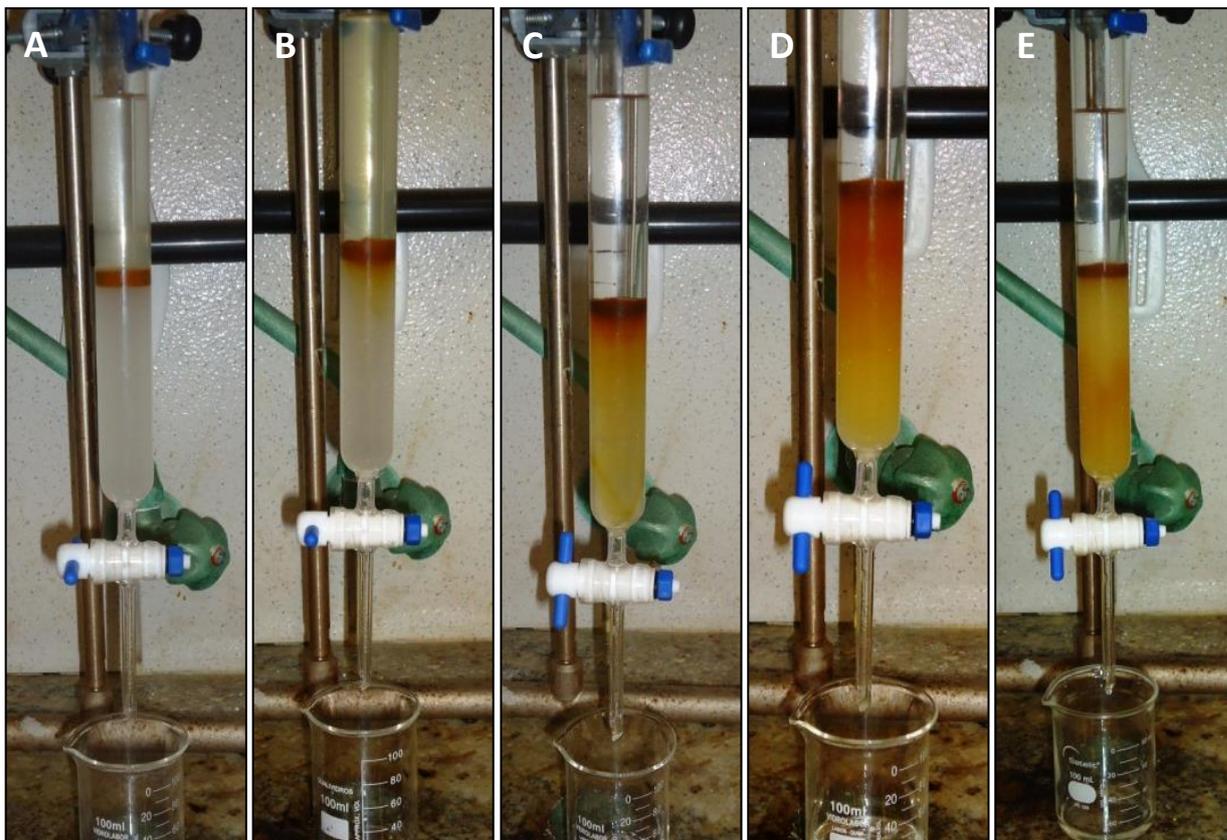
O aparato da coluna foi montado em uma capela, a sílica acondicionada com o solvente de início (hexano) e o material vegetal (macerado com auxílio de almofariz e pistilo) depositado na parte superior da coluna. Foi padronizada a proporção de 1:15 (1 g de extrato bruto e 15 g de SiO<sub>2</sub>). A quantidade de cada solvente utilizado foi uma proporção de oito vezes o volume de sílica na coluna (calculada pela equação:  $V_{SiO_2} = \pi \cdot r^2 \cdot h$ , onde “r” é o raio da coluna e “h” a altura que

a sílica ocupa na coluna, em cm). Observou-se na coluna utilizada (1,0 cm de raio) que 15,0 g de  $\text{SiO}_2$  atinge uma altura de aproximadamente 10 cm. Portanto, aplicando os valores na equação chegamos ao volume de 30 mL, ou seja, a quantidade de cada solvente a ser utilizada foi de 240 mL (8 vezes o volume de sílica).

Os solventes foram eluídos pela coluna em ordem crescente de polaridade: hexano  $\rightarrow$  clorofórmio  $\rightarrow$  acetato de etila  $\rightarrow$  etanol  $\rightarrow$  metanol. As frações foram acondicionadas em vidro âmbar e em seguida tiveram o solvente evaporado com o auxílio de placas de petri (previamente pesadas) no banho-maria com temperatura inferior a 50 °C.

Foram utilizadas nos ensaios farmacológicos as frações clorofórmica (FCIF), acetato de etila (FACF), etanólica (FEF) e metanólica (FMF).

**Figura 9 – Fracionamento do extrato bruto da *C. arabicus*. A (fase hexânica); B (fase clorofórmica); C (fase acetato de etila); D (fase etanólica); E (fase metanólica).**



Fonte: Autor, 2013.

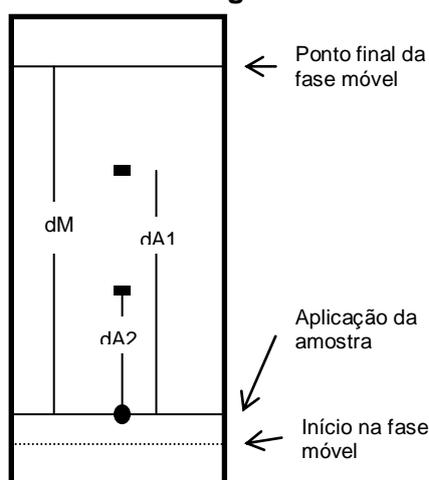
### 3.4 Análise cromatográfica

#### 3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações obtidas foram analisadas por CCD sobre cromatoplasas padronizadas, com dimensões de 5,0 cm x 2,0 cm, com base em alumínio e tendo como fase estacionária gel de sílica de fase normal, ativadas a 100°C por 30 minutos. As frações foram diluídas em metanol e aplicadas nas cromatoplasas a uma distância de 0,5 cm da base com capilares de vidro (Figura 10).

Em seguida, cada placa foi para a cuba cromatográfica, previamente preparada, para que a ocorresse a eluição da amostra pela fase estacionária até 0,5 cm do topo da coluna.

**Figura 10 – Esquema de um cromatograma obtido por cromatografia em camada delgada.**



Fonte: Autor, 2013.

$dM$  = distância percorrida pela fase móvel;  $dA1$  = distância da primeira banda;  $dA2$  = distância percorrida pela segunda banda.

Após alguns testes observou-se que para ocorrer uma separação visível dos constituintes de cada fração era necessária a eluição com uma combinação de solventes diferentes. As frações FCIF e FAcF foram eluídas com uma combinação de hexano/clorofórmio (25:75), a fração FEF foi eluída em acetato de etila/metanol (90:10) e a fração FMF eluída em metanol P. A.

Após a eluição e secagem dos cromatogramas obtidos, os mesmos foram observados sob a luz ultravioleta e, posteriormente, revelados com uma solução de sulfato cérico e levados à estufa a uma temperatura de 100 °C por 10 minutos. Após a revelação, foram observados os fatores de retenção ( $R_f$ ) dos constituintes da amostra segundo a equação:

$$R_f = \frac{dA}{dM}$$

dA = distância percorrida pela amostra;

dM = distância percorrida pela fase móvel.

#### 3.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) das frações FCIF e FMF

Os cromatogramas das frações FCIF e FMF foram obtidos pelo cromatógrafo líquido Shimadzu (Japão) equipado com bomba LC-10ADvp, controladora SCL-10Avp, degaseificador DGU-14A e detector SPD-M20A. Injetor manual Rheodyne 7725(i). Coluna C18 (Shimadzu, Japão) (250 x 4,6 mm; 5mm).

As análises cromatográficas foram realizadas com solventes ultrapuros: água Milli-Q obtida em equipamento MILLIPORE Simplicity UV e metanol grau HPLC J.T. Baker, filtrado em membrana de nylon 0,45 mm x 47 mm com sistema SUPELCO, próprio para filtração de solventes. As amostras foram solubilizadas em metanol grau HPLC e filtradas em filtro de seringa MILLIPORE Millex - HV 0,45 mm, PVDF (Polifluoreto de vinilideno) acoplado a seringa HAMILTON 5 mL.

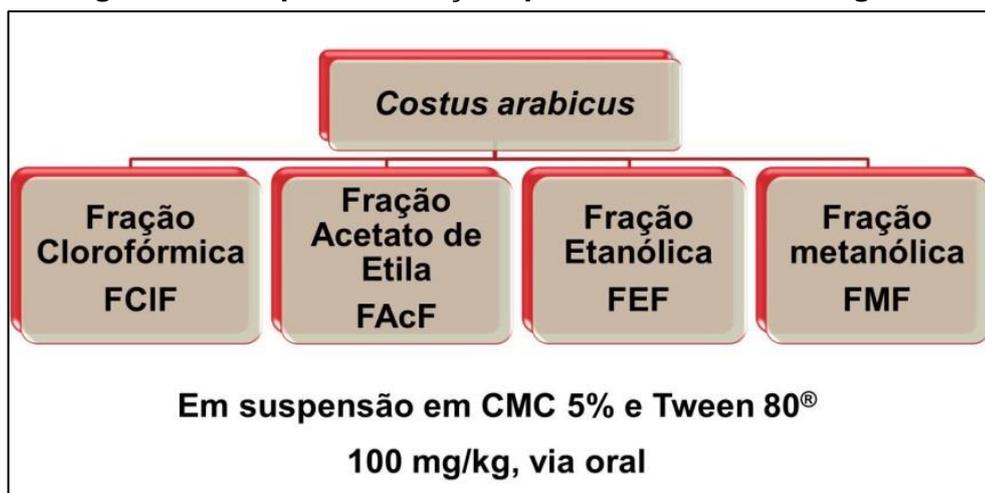
A eluição por gradiente consistiu em concentração inicial de metanol 5% a 100%, num tempo de 60 min, permanecendo nessa condição mais 10 min. Resultando numa corrida para obtenção de perfil cromatográfico com tempo total de 70 min. O fluxo adotado foi de 1,0 mL. min<sup>-1</sup>.

### 3.5 Ensaios farmacológicos

#### 3.5.1 Preparo das frações e fármacos para ensaios farmacológicos

Todas as frações testadas (FCIF, FAcF, FEF, FMF) assim como os fármacos utilizados como padrão (dipirona e indometacina) foram suspensas em CMC 5% (carboximetilcelulose) com o auxílio de quantidade suficiente do tensoativo Tween 80<sup>®</sup> (Figura 11). Já a morfina foi diluída em solução de cloreto de sódio a 0,9%. Foi padronizada a dose de 100 mg/kg para todas as frações, em todos os ensaios, 33,0 mg/kg para a dipirona, 36,0 mg/kg para indometacina e 5,7 mg/kg para morfina. Em todos os ensaios, as frações foram administradas por via oral, assim como o fármaco padrão, exceto a morfina que foi administrada por via intraperitoneal.

**Figura 11 – Preparo das frações para ensaios farmacológicos.**



Fonte: Autor, 2013.

#### 3.5.2 Animais

No desenvolvimento da pesquisa, foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* de ambos os sexos, pesando entre 25-30 g, com 6 a 8 semanas de idade, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas. Após o período de desmame os animais foram alimentados com ração própria para este tipo de roedores e água mineral em quantidade suficiente.

Em cada ensaio, foram utilizados seis grupos com seis animais cada, um grupo tratado apenas com o veículo utilizado na suspensão das frações, um grupo

tratado com o fármaco padrão e quatro grupos tratados, cada um, com uma das frações testadas.

No mínimo 24 horas antes da realização dos experimentos, os animais eram trazidos do biotério central e mantidos em gaiolas (do tipo Kaefiq produzida em polipropileno, autoclavável, resistente a ácidos, nas medidas 45x60x25 - LxCxA), em grupos de seis no Laboratório de Farmacologia e Imunidade, aclimatados a  $22 \pm 2$  °C em um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro, tratados com água e ração *ad libitum*. Além disso, a sala utilizada para ambientação dos animais era dotada de sistema de exaustão do ar.

Antes de realizar cada um dos ensaios farmacológicos, os animais foram mantidos em jejum por um período de 8 horas, com livre acesso à água. Durante os experimentos, foram utilizadas técnicas de imobilização animal em consonância com os métodos preconizados pelo comitê de ética para utilização de animais de laboratório. Ao término de cada ensaio, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e enviados ao Biotério Central para incineração.

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, nº 037/2012 (ANEXO).

### 3.5.3 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

O protocolo experimental utilizado nesse ensaio foi semelhante ao proposto originalmente por Collier et al. (1968), com pequenas modificações. Nesse método, a nocicepção é induzida por ácido acético 0,6% que atua como um estímulo algíco quando injetado na cavidade peritoneal do camundongo. A resposta do animal ao estímulo é representada por uma sequência de contrações da musculatura abdominal juntamente com a extensão dos membros inferiores (Figura 12).

Quarenta minutos antes da injeção do ácido acético, os animais foram tratados com as frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus* ou dipirona. O grupo controle recebeu apenas o veículo utilizado na suspensão das frações. Cinco minutos após a administração do agente algíco foi registrado o número de contorções abdominais produzidas pelo animal durante 20 min.

**Figura 12 – Esquema do ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.**

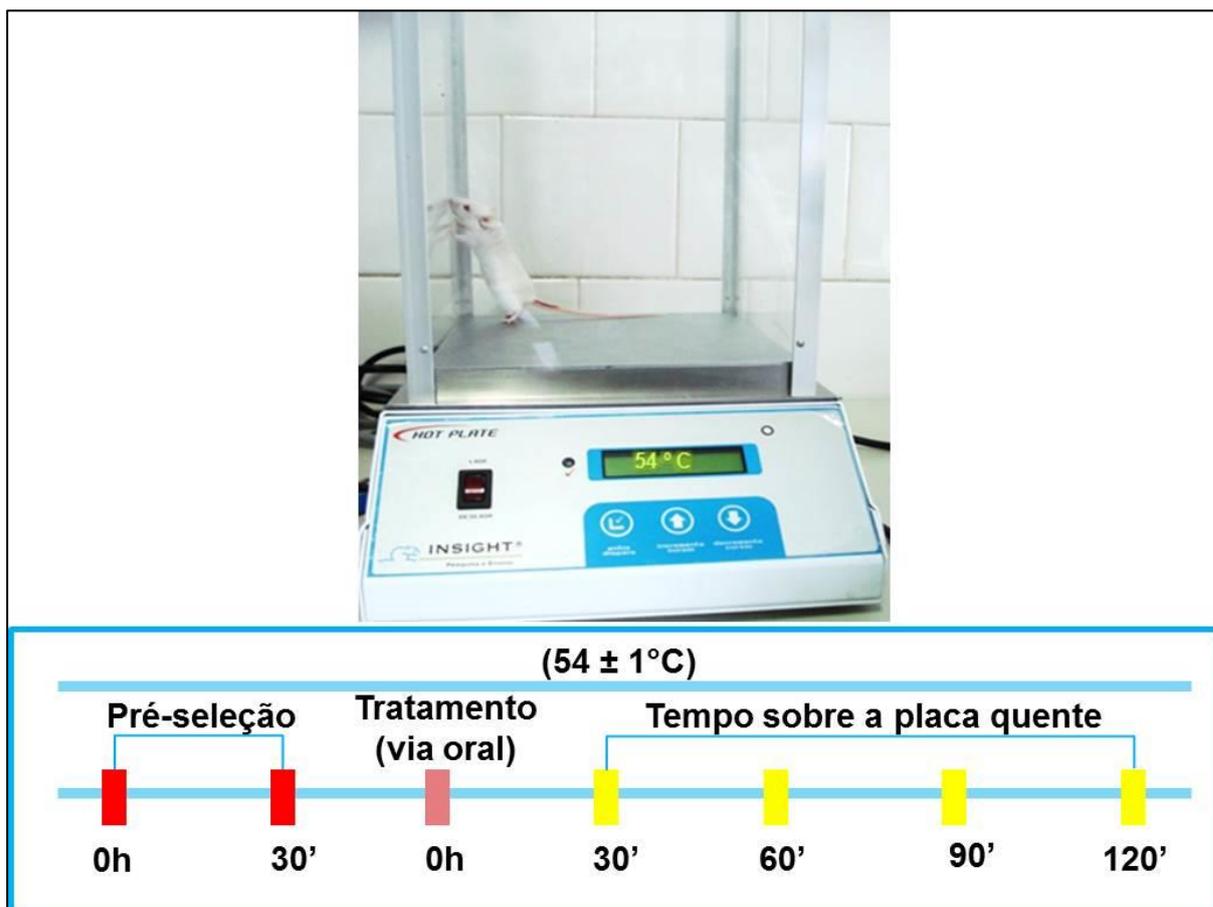


Fonte: Adaptado de, DA MATTA, 2012.

### 3.5.4 Ensaio de placa quente

A atividade antinociceptiva central das frações da *C. arabicus* foi avaliada utilizando o modelo da placa quente, descrito por Kuraishi et al. (1983). Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida a  $54 \pm 1,0$  °C (Figura 13) e sua resposta ao estímulo térmico, tempo em segundos que o animal levou para lamber, levantar ou morder uma de suas patas dianteiras ou traseiras (tempo de latência) foi cronometrada. Foram feitas duas medidas controle num intervalo de 30 minutos (pré-seleção), a primeira leitura foi realizada para adaptar o animal à placa aquecida e eliminar os animais com maior e menor tempo de latência na placa, estabelecendo-se o tempo máximo de permanência do animal na placa de 15 s. Já a segunda leitura serviu como controle. Em seguida, os animais foram tratados com as frações FCIF, FAcF, FEF, FMF, veículo ou morfina, e após um intervalo de 30 minutos novas medidas do tempo de latência foram registradas em intervalos de 30 minutos até 2 h após o tratamento.

Figura 13 – Esquema do ensaio de placa quente.

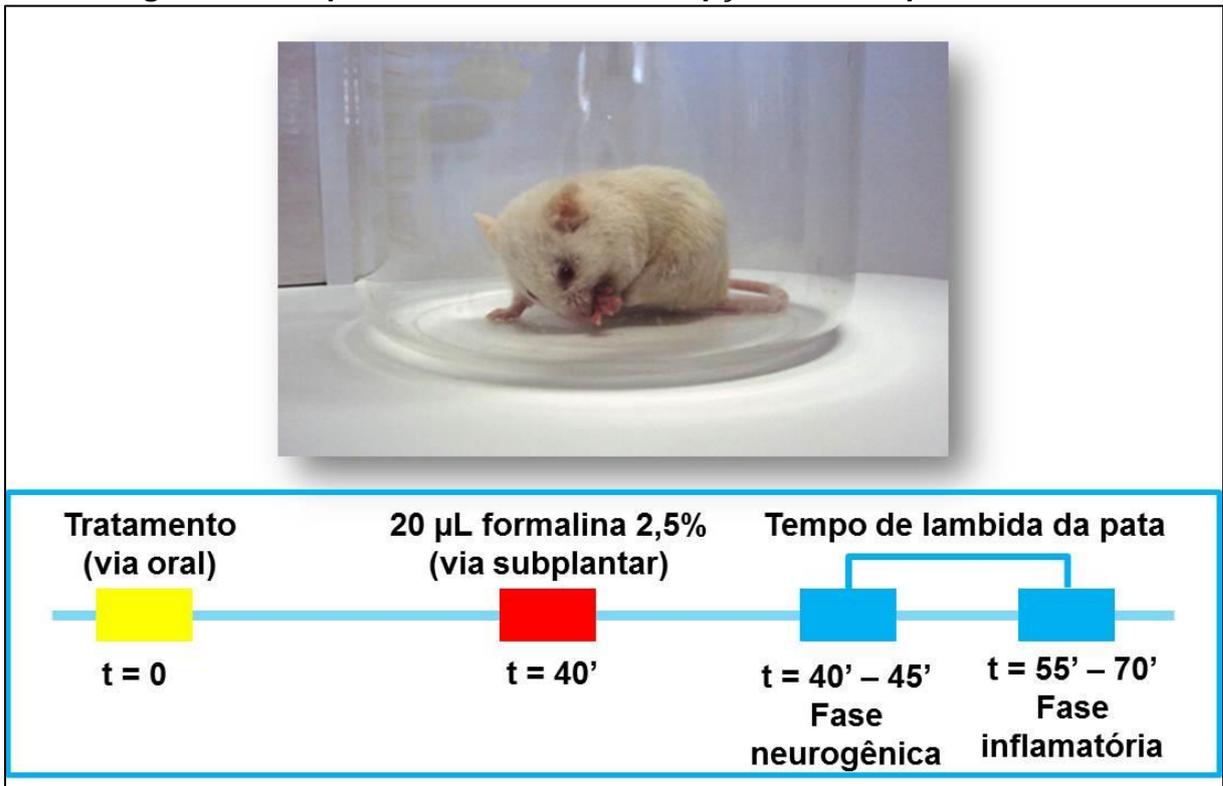


Fonte: Adaptado de, DA MATTA, 2012.

### 3.5.5 Ensaio de nociceção induzida por formalina

O procedimento utilizado para realização desse ensaio foi similar ao descrito por Hunskaar e Hole (1987). Para isso, os camundongos receberam uma injeção subplantar (s.pl.) de 20 µl de formalina - formaldeído diluído em solução salina (2,5%) - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com as frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*, indometacina ou o veículo. Após a administração da formalina os animais foram imediatamente colocados, individualmente, em um béquer e cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo, mordendo ou batendo a pata, sendo esse tempo considerado como indicativo de nociceção (Figura 14). Os primeiros 5 minutos cronometrados representam a fase neurogênica do ensaio e os últimos 15 minutos representam a fase inflamatória, totalizando 30 minutos.

**Figura 14 – Esquema do ensaio de nociceção induzida por formalina.**

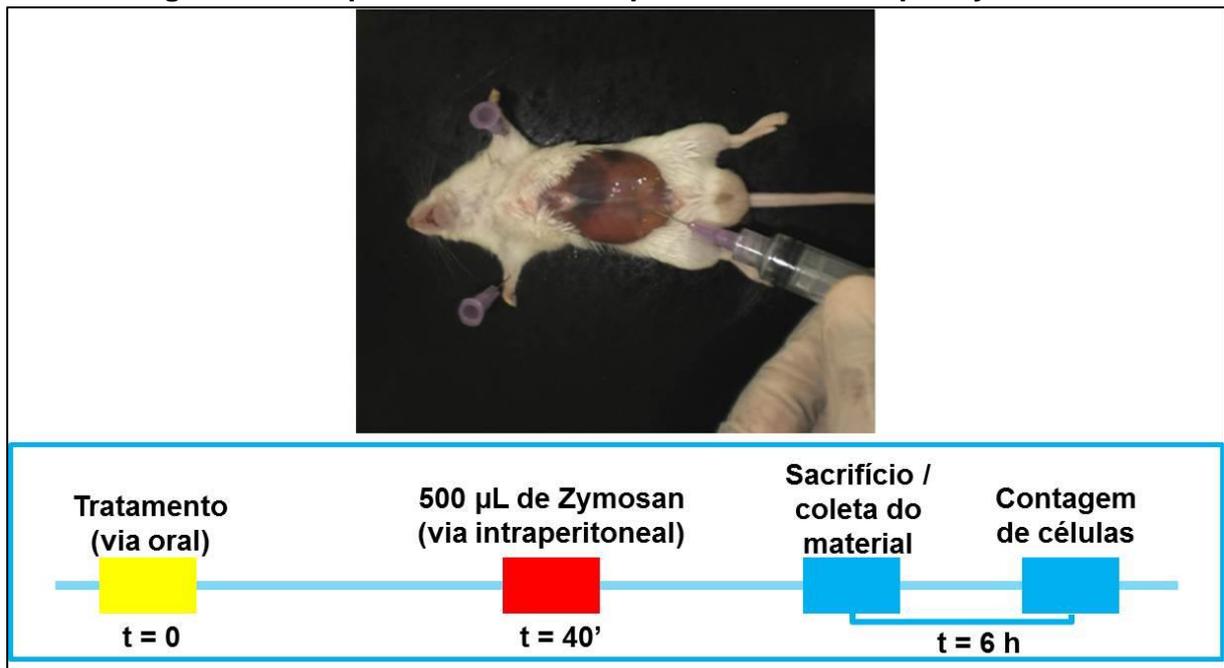


Fonte: Adaptado de, DA MATTA, 2012.

### 3.5.6 Ensaio de peritonite induzida por zymosan

Seguindo a metodologia descrita por Doherty et al. (1985) os camundongos foram tratados com as frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*, indometacina ou veículo, e após 40 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, pela administração de 500  $\mu$ L/cavidade intraperitoneal de uma solução de zymosan (2,0 mg/mL) dissolvida em salina estéril. Após 6 h da injeção de zymosan, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e a cavidade peritoneal foi lavada com 3,0 mL de tampão fosfato salina pH 7,4 (PBS). Após a massagem do abdômen, o fluido peritoneal foi coletado (cerca de 2,0 mL) e a contagem total das células foi realizada (Figura 15).

**Figura 15 – Esquema do ensaio de peritonite induzida por Zymosan.**



Fonte: adaptado de, DA MATTA, 2012.

Para a contagem do número total de células, 10 µL do fluido peritoneal de cada animal foi coletado, diluído e homogeneizado em 190 µL de azul de Tripán, obtendo uma diluição de 1:20. Dessa solução, 10 µL foram transferidos para a câmara de Neubauer onde foi realizada a contagem (2 quadrantes) com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 40x. O número de células recrutadas foi obtido utilizando o cálculo abaixo:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células/mL} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de células}}{\text{n}^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

### 3.5.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras e as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais e controle foram verificadas por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas no tutorial GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 5.1.



#### 4.1 Preparo e obtenção das frações da *C. arabicus*

No final do processo extrativo, podemos observar que o extrato bruto tem como características uma consistência pastosa, de cor escura (marrom esverdeado). Utilizando-se 50,0 g das folhas da *C. arabicus*, o rendimento médio é de 3,0 g de extrato bruto. Já as frações apresentam uma consistência um pouco mais sólida e uma tonalidade mais clara (marrom claro), exceto as frações metanólica e etanólica que são mais escuras (marrom esverdeado). A partir dos 3,0 g de extrato bruto obtivemos as frações que foram avaliadas quanto às propriedades farmacológicas. O rendimento médio das frações está descrito na tabela 1.

**Tabela 1 – Rendimento médio das frações da *C. arabicus* a partir de 3,0 g de extrato bruto.**

<b>Frações</b>	<b>Rendimento (mg)</b>	<b>%</b>
<b>FCIF</b>	30	1
<b>FAcF</b>	140	4,7
<b>FEF</b>	460	15,3
<b>FMF</b>	160	5,3

Fonte: Autor, 2013.

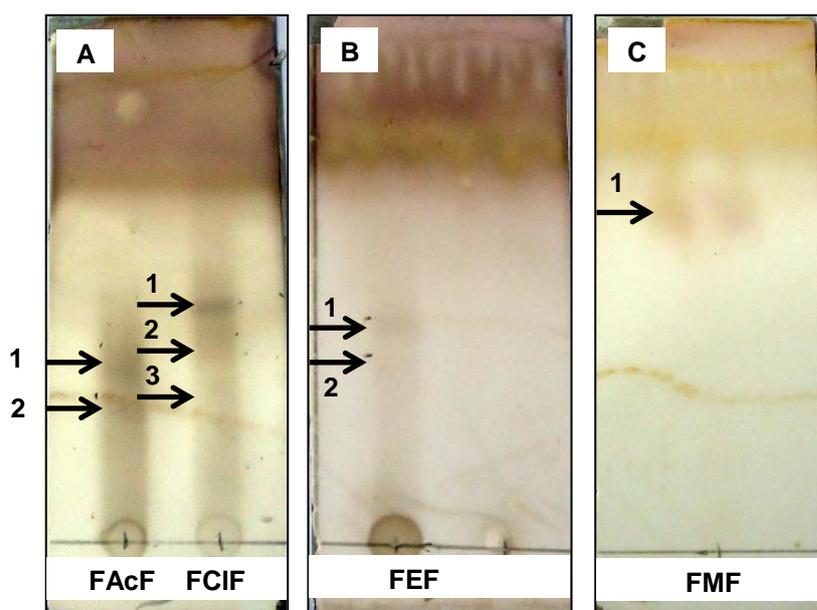
FCIF = Fração clorofórmica da folha; FAcF = Fração acetato de etila da folha; FEF = Fração etanólica da folha; FMF = Fração metanólica da folha.

## 4.2 Análise cromatográfica

### 4.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na cromatografia em camada delgada (Figura 16) podemos observar que a fração FAcF (A) apresenta duas bandas (1 e 2) com fatores de retenção ( $R_f$ ) 0,6 e 0,5, respectivamente. A fração FCIF (A) apresentou três bandas muito próximas (1, 2 e 3) com  $R_f = 0,7$ ; 0,6 e 0,5, respectivamente. A fração FEF (B) apresentou duas bandas claras (1 e 2) com  $R_f = 0,6$  e 0,5, respectivamente. Já na fração FMF, podemos observar apenas uma banda com  $R_f = 0,8$ .

**Figura 16 – Cromatografia em camada delgada das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*.**



Fonte: Autor, 2013.

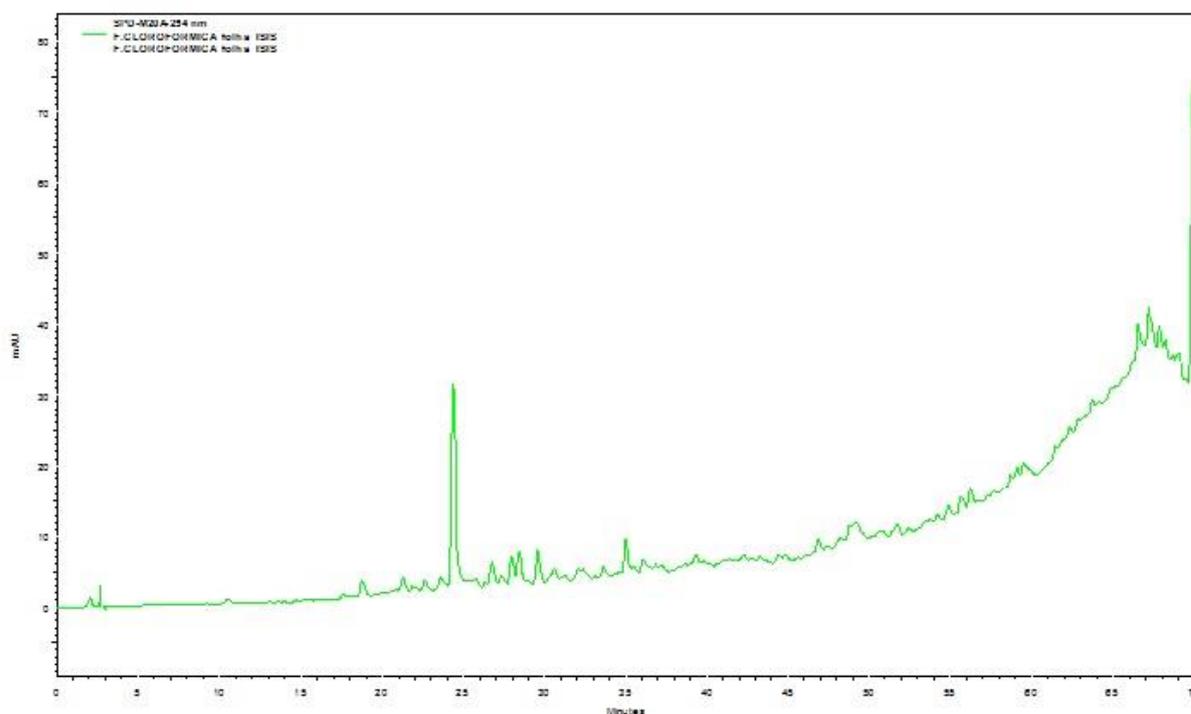
Fase móvel: A (hexano:clorofórmio – 25:75); B (acetato de etila:metanol – 90:10); C (metanol). As setas representam os locais onde foram visualizadas bandas com os constituintes separados.

FCIF = Fração clorofórmica da folha; FAcF = Fração acetato de etila da folha; FEF = Fração etanólica da folha; FMF = Fração metanólica da folha.

#### 4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatograma da fração FCIF nos mostra que uma substância contida na fração apresenta pico de absorção no  $\lambda$  (comprimento de onda) próximo de 254 nm, com tempo de retenção aproximado de 25 min, com polaridade intermediária (40% de metanol) e outro pico de maior intensidade com tempo de retenção em 70 minutos (100% metanol) que apesar de não ter sido eluído completamente, podemos observar uma forte interação com a fase estacionária caracterizando uma substância menos polar que a do primeiro pico amplamente solúvel em metanol (Figura 17).

**Figura 17 – Cromatograma da fração FCIF da *C. arabicus*.**

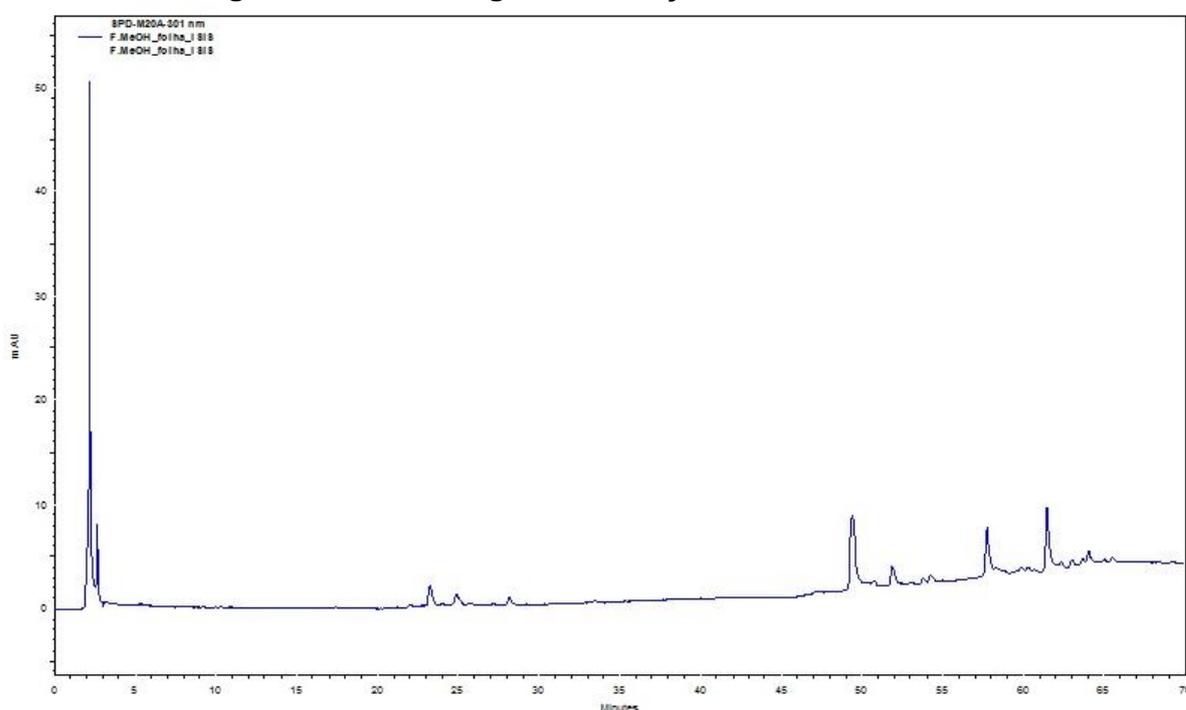


Fonte: Autor, 2013.

FCIF = Fração clorofórmica da folha.

Já no cromatograma da fração FMF da *C. arabicus*, o melhor comprimento de onda observado foi na faixa de 300 nm, mostrando característica de compostos com grupos cromóforos, possivelmente compostos com grupos aromáticos ou duplas conjugadas. O maior pico foi eluído poucos minutos após do início da corrida (aproximadamente 2 minutos), mostrando uma baixa interação com a fase estacionária e grande afinidade com o solvente mais polar, outros picos são observados nos tempos de retenção 50, 58 e 62 minutos, apresentando polaridade decrescente por possuírem maior afinidade pela fase estacionária (Figura 18).

**Figura 18 – Cromatograma da fração FMF da *C. arabicus*.**



Fonte: Autor, 2013.

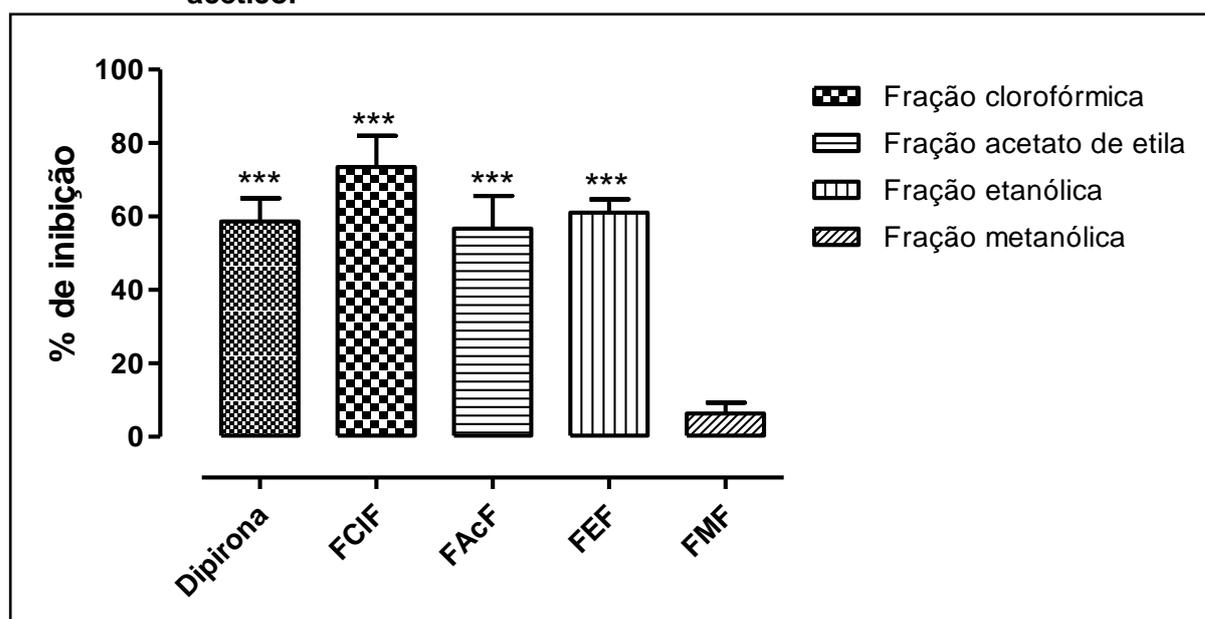
FMF = Fração metanólica da folha.

### 4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*

#### 4.3.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, apenas as frações FCIF, FAcF e FEF (100 mg/kg, via oral) da *C. arabicus* inibiram significativamente o número de contorções abdominais ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 1). Quando comparadas ao grupo controle ( $25,2 \pm 1,8$  contorções), as frações da *C. arabicus* inibiram 73,52% (FCIF), 56,69% (FAcF), 61,07% (FEF) e 6,3% (FMF) do nº de contorções, já a dipirona (33 mg/kg, via oral) inibiu em 58,69%.

**Gráfico 1 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e dipirona (33 mg/kg, via oral) no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.**



Fonte: Autor, 2013.

As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente (n = 6). ANOVA one way seguido pelo teste de Dunnet; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.3.2 Ensaio de placa quente

No ensaio de placa quente ( $54 \pm 1$  °C) o tratamento com as frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) não aumentou o tempo de latência dos animais sobre a placa quente. A morfina (5,7 mg/kg, via intraperitoneal), fármaco padrão, aumentou significativamente o tempo de latência dos animais na placa no período de 30, 60 e 90 minutos (Tabela 2).

**Tabela 2 – Efeito antinociceptivo central das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e da morfina (5,7 mg/kg, via intraperitoneal) no ensaio de placa quente.**

Grupo	Pré-tratamento	Pós-tratamento			
		30 min	60 min	90 min	120 min
<b>Controle</b>	2,18 ± 0,20	2,05 ± 0,16	2,09 ± 0,20	1,75 ± 0,15	2,59 ± 0,19
<b>Morfina</b>	1,8 ± 0,50	9,0 ± 1,60***	7,40 ± 0,80***	5,30 ± 0,80**	2,50 ± 0,20
<b>FCIF</b>	1,53 ± 0,08	1,49 ± 0,12	2,24 ± 0,17	2,15 ± 0,09	2,41 ± 0,12
<b>FACF</b>	2,27 ± 0,20	3,16 ± 0,52	3,81 ± 0,89	2,24 ± 0,97	2,68 ± 0,80
<b>FEF</b>	1,73 ± 0,04	1,73 ± 0,17	2,23 ± 0,14	1,95 ± 0,21	1,94 ± 0,17
<b>FMF</b>	2,31 ± 0,49	2,45 ± 0,38	2,64 ± 0,60	2,11 ± 0,33	2,95 ± 0,50

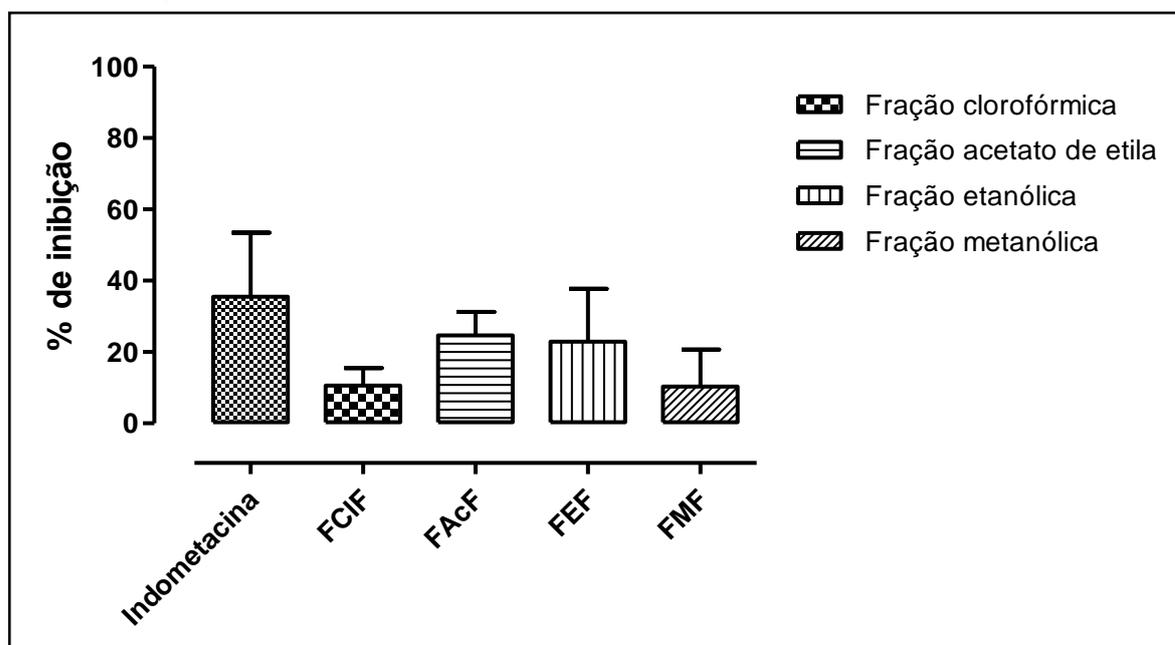
Fonte: Autor, 2013.

FCIF (fração clorofórmica); FACF (fração acetato de etila); FEF (fração etanólica); FMF (fração metanólica). Os valores representam o tempo (em segundos) de permanência do animal sobre a placa quente ± e.p.m. (n = 6). ANOVA one way seguido pelo teste de Dunnet; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.3.3 Ensaio de nociceção induzida por formalina

Na primeira fase do ensaio de nociceção induzida por formalina, os grupos tratados com as frações da *C. arabicus* reduziram o tempo de lambida em 10,57% (FCIF), 24,68% (FAcF), 22,96% (FEF) e 10,37% (FME) quando comparados ao controle ( $46,0 \pm 7,0$  segundos), já a indometacina reduziu em 35,47% (Gráfico 2). Dessa forma, nessa fase do ensaio, nenhuma das frações avaliadas apresentou redução significativa ( $p > 0,05$ ) no tempo de lambida.

**Gráfico 2 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e indometacina (36 mg/kg, via oral) na fase neurogênica do ensaio de nociceção induzida por formalina.**

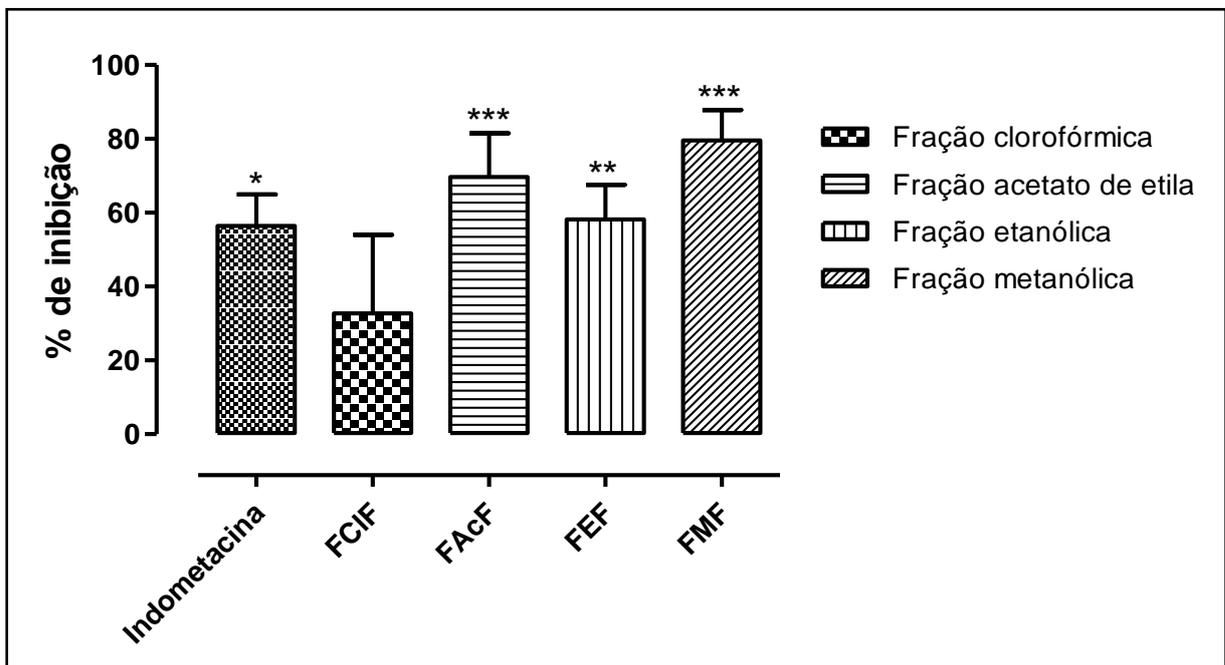


Fonte: Autor, 2013.

As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente ( $n = 6$ ). ANOVA one way seguido pelo teste de Dunnet;  $p > 0,05$ .

Na segunda fase desse ensaio, os grupos tratados com as frações reduziram o tempo de lambida em 32,72% (FCIF), 69,64% (FAcF), 58,16% (FEF) e 79,55% (FMF) quando comparados ao controle (111,7 ± 12,4 segundos), já a indometacina reduziu o tempo em 56,48% (Gráfico 3). Dessa forma, na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina, as frações FAcF, FEF e FMF apresentaram redução significativa no tempo de lambida da pata.

**Gráfico 3 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e indometacina (36 mg/kg, via oral) na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina.**



Fonte: Autor, 2013.

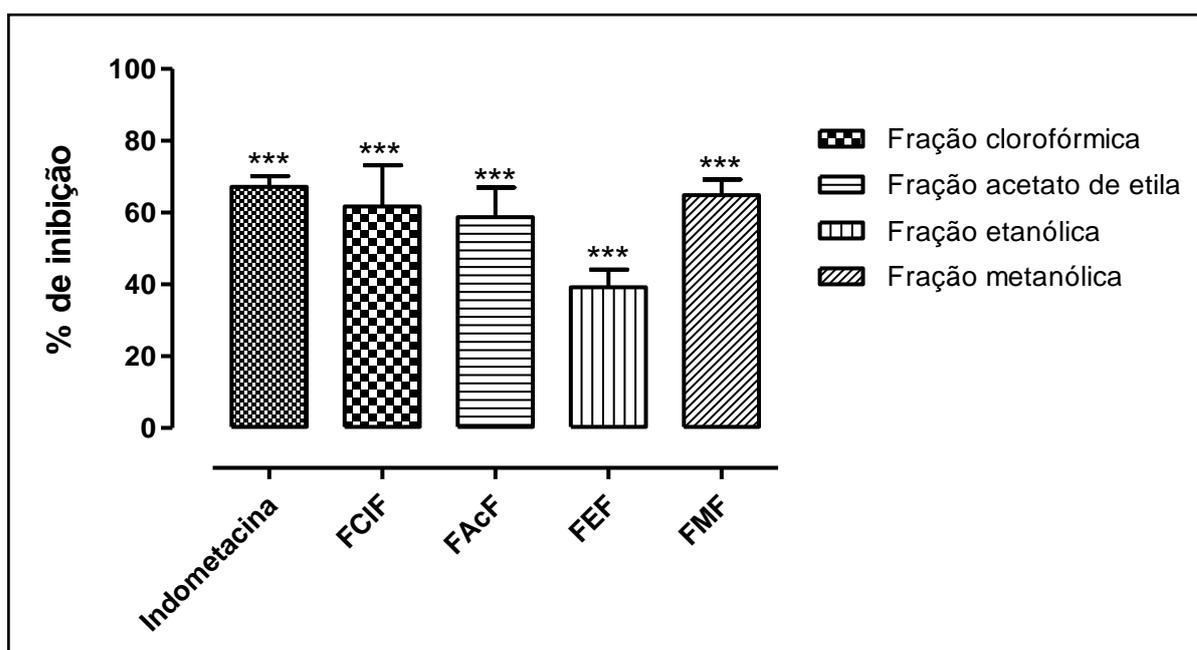
As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente (n = 6). ANOVA one way seguido pelo teste de Dunnet; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.4 Efeito anti-inflamatório das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*

##### 4.4.1 Ensaio de peritonite induzida por zymosan

No ensaio de peritonite induzida por zymosan, os grupos tratados com as frações FCIF, FAcF, FEF e FMF (100 mg/kg, via oral) inibiram o recrutamento leucocitário em 61,76% (FCIF), 58,72% (FAcF), 39,17% (FEF) e 64,82% (FMF), já a indometacina (36 mg/kg, via oral) inibiu a migração celular em 67,18% quando comparados ao grupo que recebeu apenas o agente flogístico ( $11,1 \pm 0,9 \times 10^6$  células) (Gráfico 4).

**Gráfico 4 – Efeito das frações da *C. arabicus* (100 mg/kg, via oral) e da indometacina (36 mg/kg, via oral) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan.**



Fonte: Autor, 2013.

As colunas e as barras verticais representam a percentagem da média e o e.p.m., respectivamente (n = 6). ANOVA one way seguido pelo teste de Dunnet; \*\*\* $p < 0,001$ .



## 5.1 Extração e fracionamento da *C. arabicus*

Tanto o extrato bruto quanto as frações utilizadas no presente estudo apresentaram um rendimento relativamente baixo, o que possivelmente constituiu o maior entrave nas análises realizadas, pois a quantidade utilizada nas análises somada às perdas durante a extração, fracionamento e nos ensaios químicos e biológicos impossibilitaram a realização de mais testes e repetição de alguns ensaios.

Pensando no produto final, na produção a nível industrial e na preservação da espécie estudada, é que são utilizadas técnicas de isolamento de princípios ativos de amostras complexas, como os extratos vegetais, tornando possível identificar substâncias ativas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). A partir daí a química medicinal utiliza o planejamento racional de fármacos, seja para sintetizar a molécula descoberta ou modificá-la no sentido de melhorar suas características (AMARAL et al., 2003).

## 5.2 Análise cromatográfica

### 5.3 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

De acordo com os cromatogramas de CCD podemos inferir que as bandas observadas após a revelação possivelmente representam os constituintes mais abundantes nas amostras. Os fatores de retenção próximos nos sugerem que os constituintes separados na eluição possuem estruturas químicas com semelhante polaridade, pois as bandas estão localizadas próximas umas das outras. Observou-se também que as frações FCIF, FAcF e FEF contêm outros constituintes que não eluíram com a combinação de solventes utilizada, e isto fica evidenciado pela mancha no local da aplicação da amostra.

Além disso, foi observado que nenhuma das amostras apresentou a característica da fluorescência sob a luz ultravioleta, possivelmente pelo fato das frações não apresentarem substâncias que contenham em sua estrutura grupamentos que emitem luz após exposição à radiação UV.

#### 5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

No cromatograma da fração FCIF observou-se a presença de dois picos de maior tempo de retenção, o primeiro por volta de 25 minutos e o segundo no final da corrida. Isso nos mostra que além desses dois picos estarem bem resolvidos, a substância do primeiro pico possui uma polaridade maior do que a substância do segundo pico, isso porque no tempo 25 minutos o solvente é constituído em sua maior parte por água, já no tempo 70 minutos o solvente é metanol puro. Esses picos apresentados nos cromatogramas da CLAE pode ter alguma relação com as bandas observadas nas placas de CCD, afinal, ambas são técnicas de separação e revelaram a presença de constituintes com polaridades distintas.

O cromatograma da fração FMF nos revelou um pico principal que eluiu logo no início da corrida (por volta de 2 minutos), indicando uma substância de polaridade elevada e pouca afinidade pela fase estacionária, pois no gradiente de solventes utilizado, a corrida se inicia com apenas 5% de metanol e 95% de água. Outros picos foram observados nos tempos 50, 58 e 61 minutos, mas com intensidades menores e maior afinidade pela fase estacionária. O pico encontrado neste cromatograma pode representar a substância visualizada na placa de CCD da fração correspondente, já que podemos observar uma banda que demonstra a substância de maior concentração na amostra.

#### **5.5 Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus***

##### 5.5.1 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

De acordo com os resultados obtidos nesse ensaio, podemos observar que as frações FCIF, FAcF e FEF da *C. arabicus* apresentaram atividade antinociceptiva, com efeito semelhante à dipirona (Gráfico 1, p. 50). Outra observação é que a via utilizada para administração das frações (via oral) e o efeito observado constituem indícios de que os componentes ativos presentes nas frações são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal. Essas informações são de grande valor no estudo e desenvolvimento de novas drogas porque a via oral de administração possui

vantagens em relação a outras vias, como: aumento da adesão terapêutica, promoção de efeitos sistêmicos, economicidade, autoadministração.

Em trabalho semelhante, Araújo (2010) demonstrou no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético a inibição significativa do nº de contorções abdominais das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica do caule da *C. spiralis*, também na dose de 100 mg/kg por via oral.

Outros trabalhos, como o de Santos (2010), que testou frações acetato de etila e metanólica das folhas de *C. spiralis* neste modelo, evidenciaram que estas frações foram capazes de inibir de forma significativa o número de contorções abdominais induzida pelo ácido acético.

A injeção do ácido acético provoca um comportamento estereotípico em camundongos caracterizado pelas contrações abdominais, às vezes acompanhadas pelo estiramento das patas traseiras (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Esse comportamento ocorre porque o ácido acético atua indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos que estimulam neurônios nociceptivos sensíveis tanto a anti-inflamatórios quanto a analgésicos opioides (FISCHER et al., 2008).

O ácido acético age como um doador de prótons que podem ativar diretamente os canais iônicos (TRPV1 e ASIC, por exemplo) que se encontram presentes nas fibras aferentes primárias (JULIUS; BASBAUM, 2001; FEIN, 2012). Além disso, o ácido na cavidade intraperitoneal promove a liberação de prostaglandinas, bradicinina, substância P, fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e IL-8 entre outros (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Porém, antagonistas adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares e inibidores da monoamina oxidase (IMAO) são substâncias que também são capazes de inibir as contorções abdominais. Podemos sugerir que apesar do ensaio de contorções abdominais induzida por ácido acético ser um método sensível para a triagem de compostos com atividade antinociceptiva, não constitui um método específico pela possibilidade de apresentar resultados falso-positivos (ELISABETSKY et al., 1995; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Os resultados obtidos neste ensaio indicam a presença de metabólitos secundários, com atividade antinociceptiva/anti-inflamatória nas frações avaliadas. É provável que a atividade antinociceptiva das frações FCIF, FAcF e FEF da *C.*

*arabicus* pode ser decorrente da modulação negativa dos processos nociceptivos desencadeados pelo ácido acético.

### 5.5.2 Ensaio de placa quente

Esse ensaio foi utilizado com a finalidade de se avaliar o efeito antinociceptivo central das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus*. Os resultados indicam que nenhuma das quatro frações testadas foi ativa nesse ensaio, pois não foram capazes de aumentar o tempo de latência do animal sobre a placa quente (Tabela 2, p. 51). Já a morfina, causou um aumento significativo no tempo de latência do animal sobre a placa quente nos tempos de 30, 60 e 90 minutos após a administração.

No trabalho desenvolvido por Araújo (2010), que avaliou o efeito central com o modelo da placa quente nas mesmas condições utilizadas neste estudo para as frações clorofórmica, acetato de etila e metanólica do caule de *C. spiralis* os resultados foram semelhantes, já que nenhuma das frações aumentou o tempo de latência do animal sobre a placa quente.

Outro estudo, realizado por Santos (2010), testou a atividade central das frações acetato de etila e metanólica das folhas da *C. spiralis*. Da mesma forma, foi observado que nenhuma fração aumentou o tempo de latência do animal sobre a placa quente, evidenciando que não existe atividade central significativa nas folhas da espécie estudada.

Quando os nociceptores são ativados diretamente pelo estímulo térmico, o camundongo tende a retirar ou lambear a pata. O estímulo doloroso é conduzido ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Os receptores envolvidos na sensação térmica são os vanilóides TRPV-1 (com limiar de ativação em torno de 43 °C) e TRPV-2 (com limiar de ativação em torno de 52 °C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Quando ativados, ocorre um influxo de  $Ca^{2+}$ , despolarização da fibra nervosa e ativação de canais de  $Na^+$  dependente de voltagem, que disparam potenciais de ação (ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE, 2005). Os fármacos que aumentam o tempo de latência do animal sobre a placa são os analgésicos opioides e os anestésicos gerais, resultado avaliado como antinocicepção a nível central (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

O ensaio da placa quente é utilizado para a avaliação de propriedades analgésicas de agonistas opiáceos. Na temperatura utilizada, o efeito analgésico da droga e outros agonistas narcóticos são facilmente identificados e quantificados usando este método. Por outro lado, a uma temperatura de 55 °C, substâncias analgésicas não narcóticas não apresentam nenhuma ou pouca atividade antinociceptiva (JANICKI & LIBICH, 1978; KURAISHI et al., 1983; HUNSKAAR, BERGE & HOLE, 1986; LE BARS, GOZARIU & CADDEN, 2001).

Além das vias dos opioides, a inibição da isoforma da enzima COX-3 (encontrada no cérebro) que possui características estruturais e catalíticas semelhantes a COX-1 e 2 pode resultar em uma nocicepção central (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). Estudos mostram que fármacos analgésicos e antipiréticos como dipirona e paracetamol inibem preferencialmente a COX-1, resultando na diminuição da síntese de PGE<sub>2</sub> e conseqüentemente um efeito antinociceptivo (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; BOTTING; AYOUB, 2005).

De acordo com os resultados obtidos neste ensaio, sugere-se que as frações da *C. arabicus* estudadas, não atuam nos mecanismos centrais, seja pela inibição da enzima COX-3 ou pela inibição dos potenciais de ação gerados pelos receptores vanilóides TRPV-1 e TRPV-2.

Algumas hipóteses podem explicar a ausência de atividade das frações quando comparada ao fármaco padrão. A primeira pode ser em relação à via de administração, pois as frações foram administradas por via oral e a morfina por via intraperitoneal, fazendo com que a absorção dos componentes ativos aconteça em tempos diferentes, ou até mesmo, que por via oral não se absorva quantidade suficiente para que se observe a atividade em estudo. Outra hipótese que podemos levar em consideração é que fatores intrínsecos da planta, sazonalidade, clima, local da coleta, entre outros fatores ambientais não favoreceram a produção suficiente de componentes ativos para a ação antinociceptiva central.

### 5.5.3 Ensaio de nocicepção induzida por formalina

Os resultados desse ensaio mostraram que nenhuma das frações da *C. arabicus* apresentou atividade antinociceptiva na fase neurogênica (Gráfico 2, p. 52). Dessa forma, a ausência de atividade nessa fase somada aos resultados do ensaio

da placa quente sugerem que a via central não está sendo inibida pelas frações testadas da *C. arabicus*.

Neste ensaio, as drogas que atuam centralmente, tais como narcóticos, conseguem reduzir o tempo de lambida da pata tanto na fase neurogênica, quanto na fase inflamatória, enquanto drogas que atuam periféricamente, conseguem reduzir a nocicepção apenas na fase inflamatória (SHIBATA et al., 1989).

Nos resultados da fase inflamatória podemos observar que as frações FAcF, FEF e FMF apresentaram redução significativa no tempo de lambida da pata, quando comparadas ao controle (Gráfico 3, p. 53). Os resultados sugerem que tais frações contêm diferentes substâncias que possivelmente estariam atuando sobre o processo nociceptivo de origem inflamatória. Contudo não podemos descartar a hipótese da FCIF apresentar atividade anti-inflamatória significativa, pois o erro padrão pode sofrer um desvio positivo ou negativo. Uma possível explicação para esse erro na segunda fase do ensaio de formalina seria algum tipo de instabilidade comportamental apresentada dos animais tratados com essa fração. Posteriormente, pretende-se reavaliar esse efeito, que não foi realizado novamente devido à escassez da fração.

Nesse ensaio, a injeção de formalina desencadeia um processo nociceptivo intenso, caracterizado pela lambida ou batida da pata irritada contra a superfície sob a qual os animais permanecem durante o experimento. A fase neurogênica é iniciada logo após o estímulo com o agente irritante e prolonga-se por cinco minutos. Essa fase é caracterizada pela estimulação predominantemente das fibras C (HUNSKAAR, HOLE, 1987). Após os cinco minutos iniciais, há um período de repouso, de aproximadamente 10 minutos, onde há ausência de resposta nociceptiva. Após o período, é iniciada a fase inflamatória, com duração de aproximadamente quinze minutos e está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina. Há também participação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  nessa fase tardia (GRANADOS-SOTO et al, 2001).

As frações do caule da *C. spiralis* que foram testadas sob o mesmo modelo de nocicepção, por Araújo (2010), mostraram que nenhuma delas apresentou atividade antinociceptiva na primeira fase. Já as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila apresentaram redução significativa no tempo de lambida na segunda fase.

No trabalho desenvolvido por Santos (2010), com as folhas da *C. spiralis*, verificou-se no ensaio de nocicepção induzida por formalina, que as frações acetato de etila e metanólica apresentaram atividade antinociceptiva apenas na segunda fase, quando diminuíram significativamente o tempo de lambida da pata.

Os dois trabalhos citados sugerem que as frações, tanto as folhas quanto o caule da *C. spiralis*, possuem componentes com atividade antinociceptiva na fase inflamatória, assim como as frações das folhas da *C. arabicus* testadas no presente estudo.

#### 5.5.4 Ensaio de peritonite induzida por zymosan

De acordo com os resultados obtidos no teste de formalina, que mostraram uma possível ação anti-inflamatória, foi avaliada a capacidade das frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus* em inibir o recrutamento leucocitário, uma das etapas do processo inflamatório, utilizando o ensaio de peritonite induzida por zymosan (Gráfico 4, p. 54).

Zymosan é um polissacarídeo insolúvel que compõe a parede das leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Quando injetado em animais experimentais induz a inflamação pela liberação de vários mediadores, como por exemplo, componentes do sistema complemento, prostaglandinas (PG) e leucotrienos (LT), fator de ativação plaquetária (PAF), espécies reativas de oxigênio e enzimas lisossomais (DOHERTY, 1985; LEITE et al., 2007). Além disso, o zymosan induz a degranulação dos mastócitos e promove a ativação de macrófagos. Quando administrados na cavidade peritoneal de animais experimentais, este agente flogístico induz o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de líquidos para a cavidade abdominal, um dos os sinais principais de inflamação (LEITE et al., 2007). Este é um passo-chave na formação de exsudado inflamatório e é seguido por um recrutamento de células polimorfonucleares (DAMAS et al., 1990; LAURIN et al., 2012).

Os resultados obtidos neste ensaio concordam com os resultados obtidos na fase inflamatória do ensaio de nocicepção induzida por formalina, indicando que componentes presentes nas frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus* possivelmente possuem atividade anti-inflamatória. Todas as quatro frações

analisadas mostraram percentual significativo no processo de inibição da migração leucocitária, quando comparadas com o controle.

No estudo de Araújo (2010), que realizou o ensaio de peritonite induzida por zymosan com as frações acetato de etila e metanólica do caule da *C. spiralis*, os resultados mostraram que ambas as frações apresentaram uma diminuição significativa no recrutamento leucocitário.

Outro trabalho nesse sentido desenvolvido por Santos (2010) que testou nesse ensaio as frações acetato de etila e metanólica das folhas da *C. spiralis*, evidenciou que ambas inibiram de forma significativa a migração de leucócitos. Esses dois trabalhos nos permite inferir que tanto as folhas quanto o caule da *C. spiralis* exercem uma atividade inibitória sobre a migração celular, assim como as frações FCIF, FAcF, FEF e FMF da *C. arabicus* testadas no presente estudo.



As frações da *C. arabicus* modulam negativamente as respostas nociceptiva e inflamatória, visto que foram capazes de inibir a nocicepção periférica no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético (FCIF, FAcF, FEF) e na segunda fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina (FAcF, FEF, FMF). Além disso, as quatro frações testadas inibiram o recrutamento leucocitário no ensaio de peritonite induzida por zymosan, corroborando com os demais resultados relacionados à presença de uma atividade anti-inflamatória. Conclui-se também que nenhuma das frações participa no processo de modulação negativa da atividade antinociceptiva central, provavelmente pelo fato de seus componentes não exercerem atividade nos mecanismos centrais da dor. No entanto, outros estudos são necessários para que se possa identificar o(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(ais) as frações exercem seu(s) efeito(s).

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o conhecimento sobre o potencial analgésico e anti-inflamatório da espécie *C. arabicus*, dando suporte a outras pesquisas com produtos naturais, fornecendo novas informações e sugerindo estudos futuros que possam originar protótipos para o desenvolvimento de medicamentos.

As perspectivas do estudo consistem na realização de uma prospecção fitoquímica para identificar quais classes de metabólitos secundários estão presentes na amostra. Além disso, pretende-se submeter as amostras à técnica de identificação por infravermelho e realizar o perfil cromatográfico das frações FAcF e FEF por Cromatografia Líquida e Alta Eficiência.

Todos os esforços serão realizados na tentativa de se isolar os constituintes responsáveis pela atividade farmacológica e na realização de estudos para elucidar o mecanismo de ação sob o qual tais substâncias exercem sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS

---

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202-209, 2007.

AMARAL, P. A.; NEVES, G.; FARIAS, F.; EIFLER-LIMA, V. L. Química Combinatória: moderna ferramenta para obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 4, p. 351-363, 2003.

ARAÚJO, F. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (*Costaceae*) e mecanismos para evitar a autopolinização. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 61-70, 2007.

ARAÚJO, M. V. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólico do caule de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (COSTACEAE)**. 2010. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2010.

BARREIRO, E. J. A Química Medicinal e o paradigma do composto-protótipo. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 26-34, 2009.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BENTLEY, R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. **Perspectives in Biology and Medicine**, v. 48, n. 3, p. 444-452, 2005.

BHANDARI, P.; BATEMAN, A. C.; MEHTA, R. L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is increased with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathology**, v. 46, p. 280-286, 2005.

BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219, 2006.

BOTTING, R.; AYOUB, S. S. COX-3 and the mechanism of action of paracetamol/acetaminophen. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 72, p. 85–87. 2005.

BRITTO, R. M. **Efeito da fração aquosa das folhas de *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe sobre a função contrátil do coração de mamíferos.** 2011. Dissertação (Mestrado em ciências da Saúde) – Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE, 2011.

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

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V.C.; YUNES, R. A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CATERINA, M. J.; JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. **Annual Review of Neuroscience**, v. 24, p. 487-517, 2001.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória de Caulerpina, um Alcaloide Bisindólico Isolado da Alga Bentônica *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh (CAULERPACEAE).** 2010. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Farmácia) – Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2010.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; DA MATTA, C. B. B.; ARAÚJO, M. V.; BARBOSA-FILHO, J. B.; LIRA, D. P.; SANTOS, B. V. O.; MIRANDA, G.E.C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Crude Methanolic Extract of Red Alga *Bryothamnion triquetrum*. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1977-1992, 2012.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemistry Research**, v. 33, p. 1970-1978, 2008.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, V. P.; HAYASHI, A. H.; CARVALHO, M. A. M.; SILVA, E. A. Aspectos fisiológicos, anatômicos e ultra-estruturais do rizoma de *Costus arabicus* L. (*Costaceae*) sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 39, p. 125-137, 2012.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

CUNHA, F. A. B.; MATIAS, E. F. F.; BRITO, S. V.; FERREIRA, F. S.; BRAGA, J. M. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. *In Vitro* Antibacterial, Phototoxic, and Synergistic Activity of Ethanol Extracts from *Costus cf. arabicus* L. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 964-968, 2011.

CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. (Org.). **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed., 2009. p. 147-212.

CUNHA, G. F. **Sangue e órgãos hemocitopoiéticos**. 2011. 1 ilustração, color. Disponível em < <http://www.teliga.net/2011/08/sangue-e-orgaos-hemocitopoieticos.html>>. Acesso em: 27 fev. 2013.

DA MATTA, C. B. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das macroalgas *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* (*Caulerpáceae*)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

DA MATTA, C. B. B.; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAÚJO, M. V.; CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 307-318, 2011.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; REMACLE-VOLON, G.; ADAM, A. Kinins and peritoneal exudates induced by carrageenin and zymosan in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.101, p.418-422, 1990.

DIOCHOT, S.; BARON, A.; SALINAS, M.; DOUGUET, D.; SCARZELLO, S.; DABERT-GAY, A. S.; DEBAYLE, D.; FRIEND, V.; ALLOUI, A.; LAZDUNSKI, M.; LINGUEGLIA, E. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. **Nature**, v. 490, p. 552-557, 2012.

DOHERTY, N. S.; POUBELLE, P. BORGEAT, P. BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandine. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-789, 1985.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE, R.R.; NUNES, D.S.; CARVALHO, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild ex R. & S.) Muell Arg. alkaloids. **Journal Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

FEIN, A. **Nociceptors and the perception of pain**. Connecticut : University of Connecticut - Health Center, 2012.

FERNANDES, J. H. M. **Semiologia ortopédica**. 2012. 1 ilustração, color. Disponível em < [http://www.semiologiaortopedica.com.br/2012\\_10\\_01\\_archive.html](http://www.semiologiaortopedica.com.br/2012_10_01_archive.html)>. Acesso em: 27 fev. 2013.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; FILHO, V. C.; SOUZA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) Leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.2, p. 235-239, 2008.

FLOR, H. Painful memories. **EMBO reports**, v. 3, n. 4, p. 288-291, 2002

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: G. Koogan., 2006.

GABOURY, J. P.; JONHSTON, B.; NIV, X. F.; KUBES, P. Mechanisms underlying acute mast cell-induced leukocyte rolling and adhesion *in vivo*. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 804-81. 1995.

GILROY, D.W.; NEWSON, J.; SAWMYNADEN, P.; WILLOUGHBY, D. A.; CROXTALL, J. D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb Journal**, v. 18, p. 489-498, 2004.

GRANADOS-SOTO, V.; ALONSO-LOPEZ, R.; ASOMOZA-ESPINOSA, R; RUFINO, M. O.; GOMES-LOPES, L. D.; FERREIRA, S. H. Participation of COX, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in formalin-induced inflammatory pain. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 44, p. 15-17. 2001.

GRIS, P.; GAUTHIER, J.; CHENG, P.; GIBSON, D. G.; GRIS, D.; LAUR, O.; PIERSON, J.; WENTWORTH, S.; NACKLEY, A. G.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-10, 2010.

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

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HIKIJ, H.; TAKATO, T.; SHIMIZU, T.; ISHII, S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 107-126, 2008.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**, v. 21., p. 101-108, 1986.

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

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919. 2001.

JANICKI, P. LIBICH, J. Detection of antagonist activity for narcotic analgesics in mouse hot-plate test. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, v. 10, p. 623-626, 1978.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KURASHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, n. 2, p. 245-252. 1983.

LAURIN, L. P.; BRISSETTE, M. J.; LEAPAGE, S.; CAILHIER, J. F. Regularion of Experimental peritonitis: a complex orchestration. **Nephron Experimental Nephrology**, v. 120, p. e41-e46, 2012.

LE BARS, D.; GOZARIUM, M; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LEEB-LUNDBERG, L. M. F.; MARCEAU, F.; MÜLLER-ESTERL, W.; PETTIBONE, D. J.; ZURAW, B. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. International union of pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 57, p. 27-77, 2005.

LEITE, D. F. P.; ECHEVARRIA-LIMA, J.; FERREIRA, S. C.; CALIXTO, J. B.; RUMJANEK, V. M. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 630-637, 2007.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. p. 4-5.

LEURS, R.; WANTANABE, T.; TIMMERMAN, H. Histamine receptors are finally "coming out". **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 22, p. 337-339. 2001.

LEVESQUE, H.; LAFONT, O. L'aspirine g travers les sikles z rappel historique. **Revue de Médecine Interne**, v. 21, p. 8s-17s, 2000.

LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

LING, P.; NGO, K.; NGUYEN, S.; THURMOND, R. L.; EDWARDS, J. P.; KARLSSON, L.; FUNG-LEUNG, W. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 161-171. 2004.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOMBARDINO, J. G.; J. A. LOWE. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. **Nature Reviews**, v. 3, p. 853-62, 2004.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M. **Neotropical Costaceae**. 2009. 1 fotografia, color. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Costaceae.htm>>. Acesso em: 27 fev. 2013.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A.C., VEIGA, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAMET, J.; BARON, A.; LAZDUNSKI, M.; VOILLEY, N. Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acidsensing ion channels. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 24, p. 10662-10670, 2002.

MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina**. 2009. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 2009.

MARSHALL, B. T.; LONG, M.; PIPER, J. W.; YAGO, T.; McEVER, R. P.; ZHU, C. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. **Nature**, v. 423, p. 190-193, 2003.

McCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MEDEIROS, M. F. T.; FONSECA, V. S.; ANDREATA R. H. P. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, p. 391-399, 2004.

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

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

MEYER, R.A. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. London: Elsevier, 2008. p. 3–34.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MONTENEGRO, M. R.; FECHIO, M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T. BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. (Org.). **Patologia: Processos gerais**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. cap. 7.

MONTUSHI, P.; SALA, A.; DAHLÉN, S.; FOLCO, G. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 404-412, 2007.

MOODY, J. O.; OKWAGBE, K. E. Topical anti-inflammatory activity of *Costus afer*. **Nigerian Journal of Natural Products and Medicine**, v. 7, p. 46-48, 2003.

NOEL, M.; CHAMBERS, C. T.; McGRATH, P. J.; KLEIN, R. M.; STEWART, S.H. The influence of children's pain memories on subsequent pain experience. **Pain**, v. 153, p. 1563-1572, 2012.

ORTEGA, M. H.; MORENO, A. O.; NAVARRO, M. D. H.; CEVALLOS, G. C.; ALVAREZ, L. D.; MONDRAGÓN, H. N. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annum* L.). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 330-332, 2007.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 55-68, 2009.

PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A.; THIRION, S. TROADEC, J. Prostaglandins and sickness *behavior*: old story, new insights. **Physiology Behavior**, v. 97, p. 279-292, 2009.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

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

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurologic Clinics**, v. 29, p. 229-245, 2006.

ROY, M.; PICHÉ, M.; CHEN, J.; PERETZ, I.; RAINVILLE, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 1-6, 2009.

SALINAS, N. R.; CLAVIJO, L.; BETANCUR, J. Una nueva especie de *Costus* (*costaceae*) de la amazonia colombiana. **Caldasia**, v. 29, p. 195-201, 2007.

SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 557-567, 2005.

SANTOS, D. L. F. Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de da frações da folha da espécie *Costus spiralis* (Jacq.) Roscoe (*COSTACEAE*). In: REUNIÃO REGIONAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES EXPERIMENTAIS, 5., 2010, Aracaju. **Anais da Federação de Sociedades Experimentais**. Aracaju: UFS, 2010. p. 68.

SCADDING, J. Neuropathic pain. **Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation**, v. 3, n. 2, p. 8-14, 2003.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H. INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SILVA, B. P.; BERNARDO, R. R.; PARENTE, J. P. Flavonol glycosides from *Costus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 87-92, 2000.

SILVA, M. A.; TREVISAN, G.; KLAFKE, J. Z.; ROSSATO, M. F.; WALKER, C. I. B.; OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; BOLIGON, A. A.; FLORES, F. C.; SILVA, C. B.; ATHAYDE, M. L.; FERREIRA, J. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Aloe saponaria* Haw on thermal injury in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, p. 1-9, 2013.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

SRIVASTAVA, S.; SINGH, P.; MISHRA, G.; JHA, K. K.; KHOSA, R. L. *Costus speciosus* (Keukand): A review. **Der Pharmacia Sinica**, v. 2, p. 118-128, 2011.

STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF $\alpha$ . **Nature**, v. 440, n. 7087, p. 1054-1059, 2006.

SZABÓ, C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 140, p. 105-112, 2003.

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews**, v. 7, p. 41-53, 2008.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handbook Experimental Pharmacology**, n. 179, p. 489-505, 2007.

TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3549-3550, 2000.

TRACEY, I.; DICKENSON, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, v. 148, p. 1308-1308e2, 2012.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TREEDE, R. D.; JANSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VALLANCE, P.; CHAN, E. N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, p. 342-350, 2001.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, v. 20, p. 73–80, 2008.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOILLEY, N.; WEILLE, J.; MAMET, J.; LAZDUNSKI, M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 20, p. 8026-8033, 2001.

WIENECKE, T.; OLESEN, J.; OTURAI, P. S.; ASHINA, M. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, v. 139, p. 106-116, 2008.

WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 5-14, 2003.

XIMENES, R. M.; NOGUEIRA, L. M.; CASSUNDÉ, N. M. R.; JORGE, R. J. B.; SANTOS, S. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SILVA, M. R.; VIANA, G. S. B.; ARAÚJO, R. M.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; MARTINS, R. D. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. essential oil. **Journal of Natural Medicines**, 7 pgs., 2013.

ZHOU, H. Y.; SHIN, E. M.; GUO, L. Y.; ZOU, L. B.; XU, G. H.; LEE, S.; ZE, K. R.; KIM, E.; KANG, S. S.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory activity of 21 ( $\alpha$ ,  $\beta$ )-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.

ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 4, p. 289-308. 2005.

ZOCCALI, C. The endothelium as a target in renal diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 20, p. S39-S44, 2007.



**ANEXO A** – Certidão de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)/UFAL.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Maceió, 12 de dezembro de 2012.

**Processo:**37/2012

**Título:** Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de frações das folhas de *Costus cf. arabicus* L. (*Costaceae*).

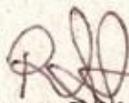
**Responsável:** Eliane Aparecida Campesatto

**Instituição/Setor de execução:** Universidade Federal de Alagoas /ICBS

**Parecer consubstanciado:**

Respondeu adequadamente todos os tópicos.

**Situação:** **Aprovado**



**Robinson Sabino da Silva  
Coordenador do CEUA-UFAL**