

THAYS DE LIMA MATOS FREIRE DIAS



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

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E DE UMA EPICATEQUINA ISOLADA DA
CASCA DO CAULE DA ESPÉCIE *Ximenia americana* L. (OLACACEAE).**

**Maceió – AL
2010**

THAYS DE LIMA MATOS FREIRE DIAS

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E DE UMA EPICATEQUINA ISOLADA DA
CASCA DO CAULE DA ESPÉCIE *Ximenia americana L.* (OLACACEAE).**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Alagoas – Instituto de Ciências
Biológicas e da Saúde para a Obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

Orientadora: Prof^a Dr^a Magna Suzana Alexandre Moreira

Co-Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana – LPRN/IQB

**Maceió - AL
2010**

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

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- D541e Dias, Thays de Lima Matos Freire.
Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico, frações de uma epicatequina isolada da casca do caule da espécie *Ximania americana* L. (Olacaceae) / Thays de Lima Matos Freire Dias, 2010.
110 f. : graf. e tabs.
- Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Co-Orientador: Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2010.
- Bibliografia: f. 85-110.
1. Produtos naturais. 2. *Ximania americana*. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade anti-inflamatória. 5. Sequestro radicalar. I. Título.

CDU: 615:576



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

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Thays de Lima Matos Freire Dias, intitulado: "Estudo da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico, frações e de uma catequina isolada da casca do caule da espécie *Ximenia americana* L. (Olacaceae)", orientada pela Prof^a. Dr^a. Magna Suzana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 30 de março de 2010.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata

Aprovada

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Lídia Moreira Lima - (UFRJ)

Prof.^a. Dra. Êurica Adélia Nogueira – Titular (ESENFAR - UFAL)

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

Aos meus filhos **Nilson, Ian e Liandra**, por me botarem no mundo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Magna Suzana Alexandre Moreira, pela oportunidade concedida no laboratório e consequente ingresso ao meio científico desde a graduação, pelo apoio que obtive sempre, pela valiosa e abnegada dedicação à pesquisa e principalmente pela visão holística do saber que transmite a todos a sua volta;

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, co-orientador deste trabalho, por todo o estudo fitoquímico e pela prontidão em ajudar sempre que necessário;

Aos amigos do LaFI: Aline, Amuzza, Anansa, Angélica, Anne, Carolina, Débora, Diogo, Eliane, Éverton, Gabriela, Luiz, Mariana, Morgana, Walfrido e Yolanda. Por todos os momentos vividos no laboratório, pelo auxílio nos experimentos e na vida, por passarmos tanto tempo juntos e ainda conseguirmos sentir saudades. Formamos uma bela equipe!

Aos amigos Daniel, Mariana e Pedro do IQB, por toda a ajuda dada na pesquisa de dados da epicatequina e do estudo fitoquímico e pela amizade tão valiosa;

Aos Professores Doutores Lídia Moreira Lima, Êurica Adélia Nogueira, João Xavier de Araújo Júnior e Emiliano Barreto, por terem aceitado o convite de integrar a banca examinadora de qualificação e defesa desta dissertação de mestrado, contribuindo significativamente para a melhoria deste trabalho;

A todos os professores que compartilharam comigo os seus conhecimentos e muitas vezes os laboratórios, em especial: Adriana Ximenes, Ana Rosa, Emiliano Barreto, Luíza Rabelo, Salete Smaniotto. Este apoio foi fundamental para a realização deste trabalho;

Aos professores, colegas e funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e do ICBS-UFAL em especial aos colegas: Alex, Guacira e Rafael pessoas maravilhosas que conheci no mestrado, a secretária Melânia Pedrosa pelo apoio administrativo e a Nailson Nunes de Souza, o “Seu Galego” pela amizade e o prazer em ajudar;

À CAPES, FAPAL e Instituto do Milênio (IM-INOVAR), pelo apoio financeiro e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus pelo seu infinito amor e misericórdia;

À minha mãe, Jeane de Lima Matos, por toda a sua loucura em tentar se transformar em todos os instrumentos necessários para a felicidade e sucesso de suas filhas e netos;

Ao meu pai José Fernando Freire Dias, pelo incentivo em diversos aspectos, por sua alma sempre jovem, pelas músicas que durante a infância foram escritas em minha alma e hoje embalam em versos vitórias e derrotas;

Ao meu muito amado esposo Eliandro Rodrigues Viana, por deixar-me acompanhar a obra prima que é a sua vida, testemunhar a prática de nobres virtudes que a maioria das pessoas só consegue ouvir falar e ainda ser digna do seu amor e companheirismo;

Ao meu avô, Valter de Souza Matos (*in memoriam*) e minha avó, Benilde de Lima Matos, por terem sido a base salutar de uma família bem sucedida onde valores como integridade, bondade e educação são as maiores riquezas que se pode conquistar;

A toda a minha família em especial as lindas e queridas tias e primas: Lelo, Miga, Mone, Sandra, Si (*in memoriam*), Yá, Taninha e Ihanny. Além de muitas outras coisas, por serem meus exemplos de como a união entre inteligência, caráter, força e bondade podem resultar em mulheres tão fantásticas. Amo muito vocês!

Às minhas irmãs Fernanda e Maureen, por todo amor e torcida pelo meu sucesso pessoal e profissional, por saber que mesmo longe sempre posso contar com as duas. Amo muito vocês!

As amigas de todas as horas, “pau para toda obra”: Adriana, Aline, Gabriela, Isabel, Larissa, Luciana, Mariana Santos, Vera Lúcia e aos amigos José Pereira Venâncio, Daniel Fortes, e Julius Holy, por tudo o que fazem por mim (escutar, tolerar, embriagar...) e por suprirem a falta que faz a minha família aqui em Maceió. Muitíssimo obrigada!

“Em terra de Reis a máscara da possibilidade torna cegos os que realmente deveriam enxergar, ou seja, os que conquistaram um olho.”

(Thays Dias)

RESUMO

Ximenia americana L. (Oleaceae) é uma planta utilizada na medicina popular em diversos países para o tratamento de inflamação e dor. Este trabalho versa sobre o estudo da atividade antinociceptiva, antiinflamatória e antioxidante do extrato etanólico, frações (aquosa, acetato, hexano e clorofórmica) e de uma epicatequina (XACC-I) isolada da casca do caule de *X. americana* L. Para avaliar a antinocicepção (na dose de 100 mg/Kg i.p., para o extrato e frações e de 100 µmol/Kg i.p. para a XACC-I) foram utilizados os ensaios: contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos; nocicepção induzida por formalina; ensaio de placa quente. No ensaio de contorções abdominais o extrato, frações e XACC-I foram capazes de induzir a inibição do número de contorções em: extrato etanólico (98,2 %), fração aquosa (95,5 %), fração hexano (92,3 %), fração clorofórmica (99,5 %), fração em acetato (95,0 %), e a XACC-I (98,5 %). Neste mesmo modelo realizou-se a curva dose-resposta da XACC-I com a dose de 1–300 µmol/Kg que induziu uma $DE_{50} = 38,3$ µmol/Kg, limite de confiança 95 %: 10,7 – 117,8 µmol /Kg e o fármaco padrão dipirona induziu uma $DE_{50} = 29,3$ µmol /Kg, limite de confiança 95 %: 22,7 – 75,4 µmol/Kg. No ensaio de nocicepção induzida por formalina o extrato etanólico e a fração aquosa na segunda fase do experimento, induziram uma inibição do tempo de lambida de pata em 82,4 e 73,7 % respectivamente, a fração clorofórmica foi capaz de induzir a inibição apenas da primeira fase do experimento em 31,5 % a XACC-I inibiu a resposta nociceptiva na fase neurogênica e inflamatória respectivamente em 64,2 % e 86,8 %. O extrato etanólico bem como todas as frações e a XACC-I não foram ativos no ensaio de placa quente, que visa à avaliação da atividade antinociceptiva central. A ação anti-inflamatória foi investigada pelo ensaio de peritonite induzida por Zymosan A e Carragenina utilizando a dose de 100 mg/Kg i.p., para o extrato e frações e de 100 µmol/Kg para a XACC-I. No ensaio de peritonite induzida por Zymosan A o extrato etanólico, frações acetato e aquosa, a XACC-I e o fármaco padrão indometacina induziram a inibição do recrutamento celular em 41,4 %, 38,6 %, 35,1 %, 46,0 % e 55,7 % respectivamente. Utilizando-se outro agente flogístico (carragenina) o extrato etanólico, frações (acetato, aquosa, clorofórmica e hexano), a XACC-I e o fármaco padrão indometacina induziram a inibição do recrutamento celular em 63,5 %, 55,9 %, 69,2 %, 35,8 %, 62,1 %, 66,1 % e 72,0 % respectivamente. Apenas o extrato etanólico e a fração hexano não induziram a morte de nenhum animal, a toxicidade aguda da XACC-I não foi avaliada pela pouca quantidade da substância. No teste de atividade sequestrante de radicais *in vitro* pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) o extrato etanólico, todas as frações e XACC-I apresentaram alta atividade sequestrante radicalar. O extrato etanólico, frações aquosa e acetato apresentaram alto teor de fenóis totais observado utilizando-se o ensaio espectrofotométrico com o reagente Folin-Ciocalteu. Diante destes dados pode-se concluir que o extrato etanólico, frações e a XACC-I provenientes da casca do caule da *X. americana* L. são capazes de modular a resposta antinociceptiva periférica e anti-inflamatória aguda.

Palavras-chave: Atividade Antinociceptiva, Atividade Anti-inflamatória, Sequestro Radicalar, *Ximenia americana*.

ABSTRACT

Ximenia americana L. (Oleaceae) is a plant used in folk medicine in several countries for the treatment of inflammation and pain. This work describes the antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of the ethanolic extract, fractions (aqueous, acetate, hexane and chloroform) and an epicatechin (XACC-I) isolated from the stem bark of *X. americana* L. The activity antinociceptive was tested in several models: acetic acid-induced writhing, formalin test and hot plate test. In the writhing test of the extract, fractions and XACC-1 were able to induce inhibition of the number of constrictions in: ethanol extract (98.2 %), aqueous fraction (95.5 %), hexane fraction (92.3 %), chloroform fraction (99.5 %), acetate fraction (95.0%), and XACC-I (98.5%). Still utilizing this model the dose-response curve of XACC-I with a dose of 1-300 $\mu\text{mol/Kg}$ was calculated, which showed an $\text{DI}_{50} = 38.3 \mu\text{mol/Kg}$, CL 95 %: 10.7 - 117.8 $\mu\text{mol/Kg}$ and standard drug dipyron showed an $\text{DI}_{50} = 29.3 \mu\text{mol/kg}$, CL 95 %: 22.7 - 75.4 $\mu\text{mol/Kg}$. In the formalin test the ethanolic extract of the aqueous fraction in the second phase of the experiment resulted in an inhibition time of paw licking in 82.4 and 73.7 % respectively, the chloroform fraction was able to induce inhibition of only early phase of the experiment by 31.5 % to XACC-I inhibited the nociceptive response in neurogenic and inflammatory phase respectively in 64.2 % and 86.8 %. The ethanol extract, all fractions and XACC-I have not been active in hot plate test, which aims to evaluate the central antinociceptive activity. The anti-inflammatory action was investigated by test of peritonitis induced by zymosan A and carrageenan. In the test of the peritonitis induced by zymosan A, the ethanolic extract, acetate and aqueous fractions, the XACC-I and the standard drug indomethacin induced inhibition of cell recruitment by 41.4 %, 38.6 %, 35.1 %, 46.0 % and 55.7 % respectively. Using the carrageenan, the ethanolic extract, fractions (acetate, aqueous, chloroform and hexane), the XACC-I and the standard drug indomethacin induced inhibition of cell recruitment in 63.5 %, 55.9 %, 69.2 %, 35.8 %, 62.1 %, 66.1 % and 72.0 % respectively. Only the ethanol extract and hexane fraction did not induce the death of any animal, the acute toxicity of XACC-I have not been evaluated. In the test of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) the ethanolic extract, all fractions and XACC-1 showed high antioxidant activity. The ethanolic extract, acetate and aqueous fractions showed high concentration of total phenols observed using the spectrophotometric assay with Folin-Ciocalteu. These results infer that the ethanol extract, fractions and XACC-I from the stem bark of *X. americana* are able to modulate the antinociceptive peripheral and acute inflammatory response.

Keywords: Activity Antinociceptive, Activity Anti-inflammatory, Radical Scavenger, *Ximenia americana*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: Hábito; B: Folhas; C: Caule lenhoso; D: Flor e espinho; E: Fruto de <i>Ximenia americana</i> L.....	28
Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides.....	30
Figura 3. Estrutura básica de algumas subclasses de flavonóides	31
Figura 4. Inibição da formação de eicosanóides através do seqüestro de radicais livres pela ação dos flavonóides antioxidantes.....	53
Figura 5. Estruturas químicas: Luteolina e Quercetina.....	53
Figura 6. Organograma da obtenção e fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de <i>X. americana</i> L.....	56
Figura 7. Organograma do isolamento fitoquímico da XACC-1	57
Figura 8. Estrutura química da epicatequina XACC-1 isolada da casca do caule da <i>X. americana</i>	57
Figura 9. Efeito da epicatequina XACC-I, extrato etanólico e frações da casca do caule de <i>X. americana</i> L. em ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	66
Figura 10A e 10B. Efeito da epicatequina XACC-I (100 µmol/Kg i.p.), do extrato etanólico e frações (100 mg/Kg i.p.), da casca do caule de <i>X. americana</i> L., em ensaio de nocicepção induzida por formalina A - Fase neurogênica. B – Fase inflamatória.....	68
Figura 11. Efeito da XACC-I (100 µmol/Kg i.p.), extrato etanólico e frações (acetato e aquosa) (100 mg/Kg i.p.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A.....	70
Figura 12. Efeito da XACC-I (100 µmol/Kg i.p.), do extrato etanólico e frações (100 mg/Kg i.p.) da casca do caule da <i>X. americana</i> L. em ensaio de peritonite induzida por Carragenina.....	71
Figura 13. Atividade sequestrante de radicais do extrato etanólico, frações (acetato de etila, hexânica, clorofórmica e aquosa) da casca do caule da <i>X. americana</i> L. todos na concentração de 100 µg/mL.....	72

Figura 14. Atividade sequestrante de radicais da XACC-I, epicatequina isolada da casca do caule da <i>X. americana</i> L. na concentração de 50 µg/mL	73
Figura 15. Estrutura química da rutina, flavonoide utilizado como padrão de sequestro radicalar.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Potência e eficácia da dipirona e da XACC-I no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	65
Tabela 2. Efeito do extrato etanólico, frações (100 mg/Kg, i.p.) e da epicatequina XACC-I (100 µmol/Kg, i.p.) da casca do caule de <i>X. americana</i> L. no ensaio da placa quente.....	69
Tabela 3. Teor de fenóis totais (FT) e atividade antioxidante (CE ₅₀) do extrato etanólico, frações e da XACC-I da casca do caule de <i>X. americana</i> L.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Araquidônico
AcOEt	Acetato de Etila
a.C.	Antes de Cristo
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina Tri-fosfato
Ca²⁺	Cálcio Bivalente
Ca⁺²- ATPASE	Cálcio adenosina-5'-trifosfatase
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
C₆H₁₄	Hexano
CHCl₃	Clorofórmio
eNOS	Óxido Nítrico Sintetase Constitutiva
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
COX-3	Ciclooxigenase 3
CPA	Área Cinzenta Periaquedutal
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
E.P.M.	Erro Padrão da Média

EtOH	Etanol
FT	Fenóis Totais
GMPc	Guanosina Monofosfato Cíclico
H⁺	Próton
H₁	Receptores de Histamina Subtipo 1
H₂	Receptores de Histamina Subtipo 2
H₃	Receptores de Histamina Subtipo 3
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenóico
5-HPETE	5-hidroperoxieicosatetraenóico
5-HT	5-hidroxitriptamina ou Serotonina
5HT1A	Receptor de Serotonina Subtipo 1 A
IgE	Imunglobulina E
IL-1	Interleucina-1
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL1-RI	Receptor para Interleucina 1
iNOS	Óxido nítrico-sintase induzida
i.p.	Intraperitoneal
IQB	Instituto de Química e Biotecnologia

LOX	Lipoxigenase
LPqRN	Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais
LT	Leucotrieno
MeOH	Metanol
Na⁺	Íon Sódio
NGF	Fator de Crescimento Neural
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NK1	Receptor de Taquicinina 1
NK2	Receptor de Taquicinina 2
NK3	Receptor de Taquicinina 3
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
NMR	Núcleo Magno da Rafe
NO	Óxido Nítrico
NRPG	Núcleo Reticular Paragigantocelular
O²⁻	Ânion Superóxido
·OH	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAG	Região Periaquedutal
P1	Receptor Purinérgico 1
P2	Receptor Purinérgico 2
P2 X	Receptores purinérgicos 2X

P2 Y	Receptores purinérgicos 2Y
PAF	Fator ativador de plaquetas
PG	Prostaglandina
PGD	Prostaglandina D
PGE	Prostaglandina E
PGF	Prostaglandina F
PGG	Prostaglandina G
PGH	Prostaglandina H
PGI	Prostaciclina I
pH	Potencial Hidrogeniônico
PKC	Proteína Kinase C
PLA₂	Fosfolipase A ₂
SG	Substância Gelatinosa
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TVRP1	Receptor vanilóide 1
TX	Tromboxano
TXA₂	Tromboxano A ₂
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
VR	Receptor Vanilóide
XACC-I	Epicatequina isolada da casca do caule de <i>Ximenia americana L.</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	24
3.1. Considerações sobre a importância terapêutica das plantas medicinais.....	25
3.2. Considerações sobre a família OLEACEAE.....	26
3.3. Considerações sobre o gênero <i>Ximenia</i>.....	27
3.4. Considerações sobre a espécie <i>Ximenia americana</i> L.....	27
3.5. Metabólitos isolados da espécie <i>Ximenia americana</i> L.....	29
3.6. Considerações sobre os flavonoides e sua importância.....	30
3.7. Dor e nocicepção.....	32
3.8. Mecanismos neurais da dor.....	33
3.9. Dor e inflamação.....	36
3.10. Mediadores da dor e inflamação.....	38
3.10.1. Citocinas.....	38
3.10.2. Cininas.....	39
3.10.3. Taquicininas.....	40
3.10.4. 5-Hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina.....	41
3.10.5. Histamina.....	41
3.10.6. Óxido Nítrico (NO).....	42
3.10.7. Fator de ativação das plaquetas (PAF).....	42
3.10.8. Eicosanoides.....	42
3.11. Considerações sobre fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.....	44
3.11.1. Analgésicos opioides.....	45
3.11.2. Anti-inflamatórios não-esteroides – inibidores da COX.....	47
3.12. Considerações sobre a atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória dos flavonoides.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1. Material botânico.....	55
4.2. Extração e fracionamento da planta.....	55

4.3. Isolamento fitoquímico.....	56
4.4. Extratos, frações e substâncias utilizadas.....	58
4.5. Modelos experimentais <i>in vivo</i>.....	58
4.5.1. <i>Animais</i>	58
4.5.2. <i>Toxicidade aguda aproximada</i>	58
4.5.3. <i>Contorções abdominais induzidas por ácido acético</i>	59
4.5.4. <i>Ensaio de formalina</i>	59
4.5.5. <i>Ensaio de placa quente</i>	59
4.5.6. <i>Ensaio de peritonite induzida por zymosan A</i>	60
4.5.7. <i>Ensaio de peritonite induzida por carragenina</i>	60
4.6. Modelos experimentais <i>in vitro</i>.....	61
4.6.1. <i>Determinação de fenóis totais</i>	61
4.6.2. <i>Análise quantitativa da atividade antioxidante</i>	61
4.6.3. <i>Construção da curva de calibração do DPPH</i>	62
4.6.4. <i>Leitura das medidas de absorbância nas amostras</i>	62
4.7. Análise Estatística.....	63
5. RESULTADOS.....	64
5.1. Toxicidade aguda aproximada.....	65
5.2. Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	65
5.3. Ensaio de nocicepção induzida por formalina	67
5.4. Ensaio de placa quente (<i>Hot-plate test</i>).....	69
5.5. Ensaio de peritonite induzida por zymosan A.....	70
5.6. Ensaio de Peritonite induzida por carragenina	71
5.7. Atividade sequestrante de radicais	72
5.8. Determinação de fenóis totais.....	73
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÕES.....	83
8. REFERÊNCIAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Desde que o homem passou a interagir e observar a natureza, ele utiliza os produtos naturais para diversas finalidades inerentes a sua existência, como: fonte de alimento, confecção do vestuário, fabricação de utensílios domésticos e moradia, na prevenção e cura para as enfermidades que o aflige (ESQUENAZI *et al.*, 2002). Diferentes populações nas mais variadas regiões do mundo utilizam correntemente os produtos naturais como único recurso terapêutico (CALIXTO, 2005). Muitos medicamentos comercializados pela indústria farmacêutica e que possuem suas propriedades farmacológicas bem descritas foram desenvolvidos a partir do conhecimento popular de plantas medicinais (GRAGG *et al.*, 1997).

A busca de plantas com atividade terapêutica tornou-se uma importante atividade científica, visando o crescimento e o aperfeiçoamento de técnicas e recursos humanos especializados, que possam colaborar com as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de fármacos capazes de contribuir para o tratamento e cura de doenças que acometem a população. Neste sentido, o governo brasileiro está dando prioridade ao estudo de plantas medicinais com ênfase à descoberta de novos medicamentos ou de substâncias que possam servir de ferramentas farmacológicas ou como modelos para a síntese de novos fármacos (BRASIL, 2009).

As plantas medicinais têm-se constituído numa das principais fontes para o estudo e desenvolvimento de novos princípios ativos devido, principalmente, à grande variedade de metabólitos secundários com atividade biológica (BARREIRO, 1991). Dentre as plantas amplamente utilizadas pela medicina popular, não apenas no Brasil, mas em diversas regiões tropicais e temperadas do mundo (OGUNLEYE & IBITOYE, 2003), encontra-se a espécie *Ximenia americana* L. que é um arbusto pertencente à família Olacaceae (POTT & POTT, 1994), conhecida popularmente no Brasil como ameixa-da-baía, ameixa-da-terra, ameixa-de-espinho, sândalo-do-brasil dentre outros nomes (BRAGA, 1976). Todas as suas partes são utilizadas na medicina popular (OMER & ELNIMA, 2003), tendo algumas atividades biológicas já descritas na literatura como atividade antitumoral e antimicrobiana (MEVY *et al.*, 2006; KONÉ *et al.*, 2004).

As diversas aplicações terapêuticas populares atribuídas a *X. americana* L. aliadas aos achados científicos, corroboram a necessidade de se investigar o potencial farmacológico desta espécie no que concerne a dor e inflamação. Pois, estima-se que a dor afeta pelo menos 30% dos indivíduos em algum momento da sua vida, sendo que a incidência de dor crônica oscila entre 7 e 40 % no mundo, constituindo a causa principal de sofrimento e incapacitação

para o trabalho, acarretando em graves conseqüências psicossociais, comprometendo fortemente a qualidade de vida destes indivíduos (SBED, 2005). Os fármacos analgésicos como os opioides e os anti-inflamatórios não-esteroidais, têm suas origens em produtos naturais que foram usados por séculos, com inúmeros benefícios à humanidade, porém, a descoberta de novos fármacos tão eficazes porém mais seguros que aqueles que estão no mercado, torna-se uma necessidade pelo fato de que muitas pessoas são acometidas pelos efeitos indesejáveis ocasionados por tais fármacos, acarretando em prejuízos financeiros e acima de tudo, prejuízos à saúde de pessoas que já sofrem, muitas vezes, de dor crônica (OLIVEIRA, 2003).

O estudo de plantas da vasta flora brasileira pode beneficiar as pesquisas voltadas para o tratamento da sintomatologia da dor e a resolução de processos inflamatórios danosos, como também amenizar os inúmeros transtornos causados pelo uso contínuo de fármacos analgésicos e anti-inflamatórios (BRATER, 1999).

Neste sentido estudos fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN, do Instituto de Química e Biotecnologia – IQB, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) utilizando-se a casca do caule de *X. americana* L., obtendo-se o extrato etanólico, a fração aquosa, fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e uma epicatequina (XACC-1) isolada da fração em acetato de etila.

Portanto, este trabalho versa sobre o estudo antinociceptivo, anti-inflamatório e a avaliação da atividade antioxidante do extrato, frações e isolado obtidos pelo LPqRN da casca do caule de *X. americana* L. Para isto, modelos *in vivo* e *in vitro* foram utilizados, como: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COOLIER *et al.*, 1968); o ensaio de nocicepção induzida por formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1985, TJOLSEN *et al.* 1992) o ensaio de placa quente (KURAISHI *et al.*, 1983); ensaios de peritonite induzida por Zymosan A e Carragenina (LEITE *et al.*, 2007; FERRANDIZ & ALCARAZ, 1991); análise quantitativa da atividade antioxidante utilizando-se o radical livre DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998); e a determinação de fenóis totais (BONOLI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2007). A análise da toxicidade aguda aproximada do extrato etanólico e frações também foi realizada (AKKOL *et al.*, 2008).

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante, bem como a toxicidade aguda aproximada, do extrato etanólico, frações (clorofórmica, hexânica, acetato e aquosa) e da epicatequina (XACC-1) isolada da casca do caule da espécie *Ximenia americana* L. (Oleaceae), contribuindo para o estudo desta planta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade aguda aproximada;
- Avaliar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção;
- Investigar uma possível ação antinociceptiva central no modelo de placa quente;
- Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação aguda;
- Avaliar a atividade antioxidante em modelos *in vitro*;
- Sugerir alternativas para a elucidação do mecanismo de atuação da XACC-1, na nocicepção e inflamação;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Considerações sobre a importância terapêutica das plantas medicinais

As plantas medicinais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica adotada mundialmente. Há relatos na literatura que aproximadamente 3000 a.C., os povos orientais, em particular os chineses, já faziam uso de plantas e outros métodos terapêuticos naturais no tratamento de diversas enfermidades (CHANG & BUT, 1987).

Segundo dados da OMS, 65-80 % da população mundial não possui acesso ao atendimento primário à saúde e dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (CALIXTO, 2005; TRIPATHI *et al.*, 2005). Sabendo-se que cerca de 49% dos fármacos que foram produzidos entre 1981 e 2001 são relacionados aos princípios isolados de plantas medicinais (CECHINEL, 1998; KOEHN & CARTER, 2005), aliado ao fato de o Brasil ser um país que apresenta um grande manancial de recursos genéticos autóctones, com a maior biodiversidade do mundo, apresentando um montante de 55 mil espécies de plantas, correspondendo a aproximadamente 21 % do total mundial catalogado (VILELA-MORALES & VALOIS, 2000), sendo que poucas dessas espécies possuem estudos científicos voltados para o desenvolvimento de fármacos (RATES, 2001), entende-se a necessidade de comprovação científica do que já se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, e que substituem, muitas vezes, a prescrição médica (LOZOYA, 1997).

As substâncias presentes nas plantas medicinais que representam o modelo que o homem utiliza para a síntese de diversos fármacos são originadas principalmente pelo metabolismo secundário realizado pela planta (WINK, 2003). Algumas importantes categorias de metabólitos secundários que apresentam compostos biologicamente ativos incluem: os glicosídeos, os alcaloides, os terpenoides, os iridoides e os flavonoides (RATES, 2001).

Muitas plantas medicinais possuíram, ao longo da história, e ainda possuem um importante papel no tratamento e cura de diversas enfermidades. O conhecimento popular aliado aos estudos científicos decorrentes do desenvolvimento da química moderna culminou no isolamento e síntese de diversas substâncias bioativas. Dentre as plantas medicinais com salutar importância no desenvolvimento de fármacos e respectivas substâncias, podemos citar: a *Cinchona* sp., da qual derivam os alcaloides quinina, com propriedade antimalárica, e quinidina com propriedade antiarrítmica; a espécie *Digitalis purpurea*, que possui o glicosídeo digoxina, que apesar de apresentar índice terapêutico reduzido é empregado até hoje como cardiotônico, em virtude de não ter sido identificado um substituto mais seguro e

com as mesmas propriedades terapêuticas (FRAGA & BARREIRO, 1996); a *Catharanthus roseus*, produtora dos alcaloides vinblastina e vincristina com propriedades antineoplásicas, de grande valor terapêutico principalmente na leucemia infantil (McCORMACK, 1990); a *Artemisia annua* da qual foi isolada a artemisinina, um sesquiterpeno com atividade terapêutica contra a malária (*Plasmodium vivax*) e contra cepas de *P. falciparum* resistentes a cloroquina (LIU *et al.*, 1992); da *Curcuma longa* foram obtidos os anti-inflamatórios curcuminoides inibidores das enzimas lipoxigenase (LOX) e ciclooxigenase (COX) (HUANG *et al.*, 1991) e sequestradores de radicais livres (RUBY *et al.*, 1998); espécies de *Galanthus* originaram a galantamina, substância isolada e usada primariamente pela população local dos Balcãs para fraqueza muscular, mostrou-se um inibidor competitivo e reversível da acetilcolinesterase. Após a produção em larga escala da galantamina através de sua extração a partir de *Narcissus* spp, estudos clínicos foram conduzidos, e hoje esta substância é utilizada para o tratamento sintomático de pacientes nos primeiros estágios da doença de Alzheimer (HOUGHTON, 2002); a *Taxus brevifolia*, espécie da qual foi isolado o taxol, um diterpenóide com atividade antitumoral (CHABNER, 1991; CORRÊA, 1995).

Os exemplos citados configuram apenas algumas dentre diversas importantes substâncias isoladas de plantas medicinais, corroborando a necessidade de se fortalecer os estudos voltados para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais, principalmente no Brasil.

3.2 Considerações sobre a família OLEACACEAE

A família Olacaceae é predominantemente das regiões tropicais e subtropicais e compreende 28 gêneros com aproximadamente 200 espécies (MALECOT *et al.*, 2004). Seus representantes são plantas lenhosas, árvores ou arbustos com espinhos. No Brasil encontram-se, aproximadamente, 13 gêneros e 60 espécies, sendo as de maior número de espécies, os gêneros *Heisteria*, *Ximenia*, *Liriosma* e *Schoepfia*, os gêneros mais encontrados no país são mais comuns na Amazônia; fora desta região destacam-se os gêneros *Ximenia* e *Heisteria* (JOLY, 2002; SOUZA & LORENZI, 2005). Embora muitas das Olacaceae possuam porte arbóreo, sem qualquer evidência externa de que sejam hemiparasitas, existem referências de que diversos exemplares dessa família apresentam este tipo de hábito, como exemplo: *Olax*, *Ptychopetalum*, *Schoepfia* e *Ximenia* (JOLY, 2002; SOUZA & LORENZI, 2005).

3.3 Considerações sobre o gênero *Ximenia*

O gênero *Ximenia* pertence: Reino: Plantae; Divisão: Magnoliophyta; Classe: Magnoliopsida; Subclasse: Rosidae; Ordem: Lamiales; Família: Olacaceae (DAS *et al.*, 2008). Apresenta diversas espécies como *X. pubescens*, *X. parviflora*, *X. caffra*, *X. americana*, *X. perrieri*, *X. intermedia* e *X. coriacea*. Entre essas espécies, a *X. caffra* se destaca por ser utilizada na Tanzânia para o tratamento da menstruação irregular, reumatismo e câncer (CHHABRA & UISO, 1990) e, na província de Limpopo, no Sul da África, para o tratamento da diarreia (MATHABE *et al.*, 2006). A espécie mais comum deste gênero no Brasil é a *Ximenia americana* L., que aparece de forma espontânea do Pará a Bahia, Minas Gerais e Mato Grosso, apresentando ampla distribuição em diversos ecossistemas florestais (JOLY, 2002; SOUZA & LORENZI, 2005).

3.4 Considerações sobre a espécie *Ximenia americana* L.

Em meio a diversas espécies de plantas medicinais utilizadas na medicina popular no Brasil e no mundo (CALIXTO *et al.*, 2003; 2004b; BASSO *et al.*, 2005), encontra-se a *X. americana* L. Espécie pertencente à família Olacaceae comumente encontrada na África, Índia, América Central e América do Sul. É uma planta cosmopolita tropical com ocorrência silvestre, inclusive nos tabuleiros litorâneos do nordeste do Brasil (POTT & POTT, 1994; SACANDE & VAUTIER, 2006; MATOS, 2007).

A *X. americana* L. é caracterizada como um arbusto de 3-4 metros, podendo chegar aos 6 metros de altura, com espinhos de casca fina, avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa, com folhas pequenas, simples, inteiras e flores branco-amareladas, aromáticas, com as pétalas recurvadas, dispostas em racemos curtos, axilares ou terminais (BRASILEIRO *et al.*, 2008). Os frutos são uma fonte rica em vitamina C, de formato arredondado, de 1,5-2,0 cm de diâmetro, suculento e apresentando uma única semente tipo amêndoa branca. A casca do fruto é uma película fina, facilmente retirada, quando o fruto está maduro (**Figura 1**). Quando verde, tem coloração da casca verde, e quando maduro, a cor da casca torna-se amarelo alaranjado. Considerando a polpa, ocorre mudança de coloração, passando da cor verde para a amarela, à medida que o fruto amadurece, possui consistência firme e sabor adocicado. Também é perceptível um aroma característico nos frutos maduros (EROMOSELE & EROMOSELE, 2002; SILVA *et al.*, 2008).

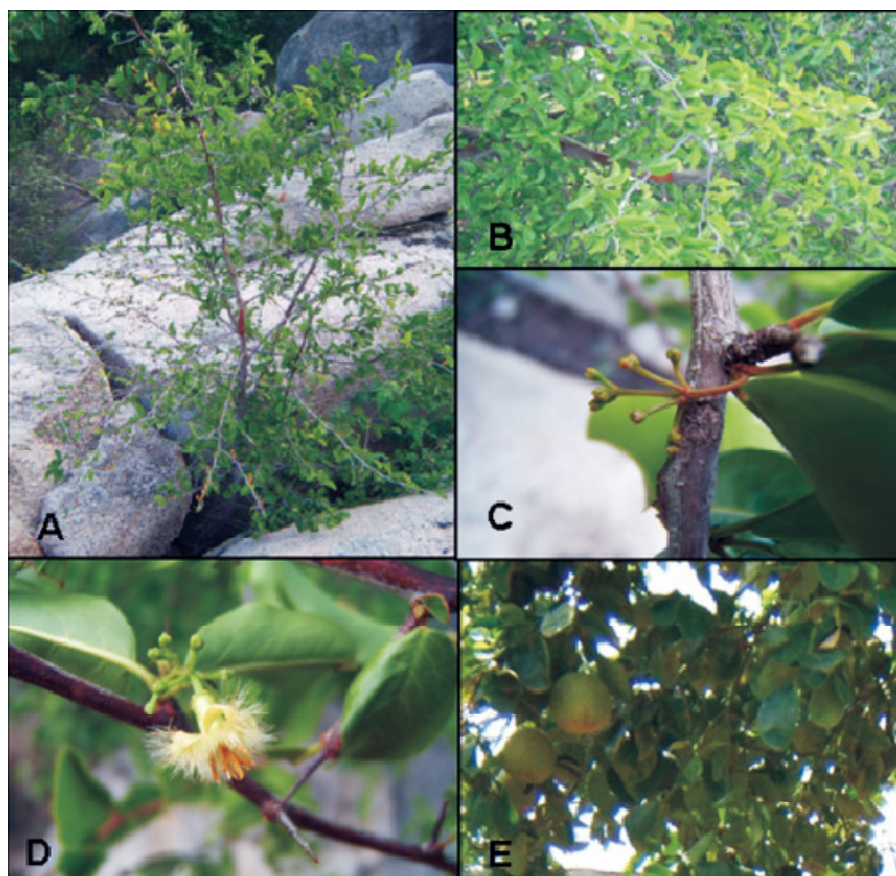


Figura 1. A: Hábito; B: Folhas; C: Caule lenhoso; D: Flor e espinho; E: Fruto de *X. americana* L. (BRASILEIRO *et al.*, 2008)

A *X. americana* L. é conhecida popularmente no Brasil como ameixa silvestre,ambuí, ameixa-da-baía, ameixa-brava, ameixa-de-espinho, sândalo-do-brasil entre outros nomes, conforme o local em que está adaptada (BRAGA, 1976; SILVA *et al.*, 2008). Em Angola é conhecida pelos nomes de ganzi, lumeque, mepeque, muije, munjaque, omupeque e umpeque (WIKIPEDIA, 2010). Todas as partes desta planta têm indicações de uso na medicina popular (BRAGA, 1976; JAMES *et al.*, 2007).

No Brasil a *X. americana* L. faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. No período seco, quando a maioria das espécies da Caatinga perde as folhas, essa planta destaca-se por apresentar-se com as folhas totalmente verdes, o que caracteriza uma planta resistente à seca (FERNANDEZ & BEZERRA, 1990).

Sua casca apresenta diversas atividades e vem sendo usada para diversos fins tais como: tratamento da lepra, malária, dor de cabeça, moluscicida, infecções da pele, hemorróidas e inflamações das mucosas (VERAS & MORAIS, 2004). A casca pulverizada também é recomendada para cicatrização de úlceras, como depurativo, regulador menstrual e

nas enfermidades gástricas. A infusão das flores é empregada para amenizar diarreias e disenterias (HUTCHINSON & DAZIEL, 1954; BRAGA, 1976). As raízes são empregadas como anti-séptico, para doenças mentais, febre, icterícia e dor de cabeça, ao passo que as folhas são usadas para sarampo, dor de dentes e também como laxante (SOFOWORA, 1982; OMER & ELIMINA, 2003). Esta planta também é utilizada contra o reumatismo, câncer e muitos tipos de infecções (MEVY *et al.*, 2006).

Estudos realizados com diferentes partes da espécie *X. americana* L. indicam que esta espécie apresenta atividade: antitumoral (VOSS *et al.*, 2006), antimicrobiana (OMER & ELNIMA, 2003; KONÉ *et al.*, 2004; GEYID *et al.*, 2005), pesticida e moluscicida (FATOPE *et al.*, 2000; UCHOA *et al.*, 2006) e anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2002).

3.5 Metabólitos isolados da espécie *Ximenia americana* L.

Tendo em vista as diversas propriedades medicinais atribuídas a *X. americana* L. estudos fitoquímicos foram realizados com esta espécie indicando a presença de metabólitos secundários em diferentes tipos de extratos desta planta. Alguns estudos relataram a ausência de alcaloides (OGUNLEYE & IBITOYE, 2003; JAMES *et al.*, 2007), outros trabalhos como o realizado por SORO *et al.* (2008) indicaram a presença de alcalóides, taninos e flavonoides no extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. QUINTANS-JÚNIOR *et al.* (2002) atribuiu a possível atividade anticonvulsivante a alcaloides presentes no extrato etanólico bruto da espécie.

Resultados obtidos utilizando extratos aquosos e metanólicos das folhas, da casca do caule e da raiz indicaram constituintes presentes na planta como: carboidratos, na forma de açúcares e amido solúvel, exceto para o extrato aquoso das folhas. Saponinas, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas estiveram presentes em todos os extratos, exceto nos extratos das folhas, onde não foram encontradas antraquinonas (JAMES *et al.*, 2007). As cascas da *X. americana* L. apresentam elevado teor de taninos que ainda não foram identificados quimicamente (MATOS, 2007). Estudos com o óleo volátil das folhas de *X. americana* L. demonstraram que continha em sua composição, 69 % de compostos aromáticos, 12,5 % de compostos lipídicos e 13 % de terpenos (MEVY *et al.*, 2006). O constituinte encontrado em maior quantidade foi o benzaldeído (63,5 %), seguido pelo cianeto de benzila (13 %) e isoforona (3,5 %). Outras partes como raiz, frutos e sementes também apresentaram óleos

ricos em ácidos graxos essenciais como: linoléico, linolênico e araquidônico (EROMOSELE & EROMOSELE, 2002; MATOS, 2007).

MWANG *et al.* (1993) isolaram da raiz de *X. americana* var. *caffra* compostos fenólicos como a catequina, epicatequina e ácido gálico, outros estudos também apontam a presença de flavonoides nesta espécie (BRASILEIRO *et al.*, 2008; SORO *et al.*, 2008).

3.6 Considerações sobre os flavonoides e sua importância

Os frutos e os vegetais são importantes na dieta humana por apresentarem componentes antioxidantes que protegem contra os radicais livres e têm sido associados à redução de risco de várias doenças degenerativas como aterosclerose, câncer, mal de Parkinson e Alzheimer (LODYATO *et al.*, 2004; ZHANG & HAMAUZU, 2004). Os compostos responsáveis pela ação antioxidante são de origem endógena como as enzimas e proteínas e exógena como as substâncias de baixa massa molecular tais como: vitaminas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e outros compostos fenólicos muito comuns em plantas (ARGOLO *et al.*, 2004; ZHANG & HAMAUZU, 2004).

Os flavonoides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um importante papel na proteção contra agentes oxidantes. Englobam um grupo de compostos polifenólicos que possuem considerável interesse científico em diversas áreas, principalmente pelas suas propriedades terapêuticas. São metabólitos secundários de plantas biossintetizados a partir da via dos fenilpropanoides (SIMÕES *et al.*, 2000). O termo flavonoide é um nome coletivo dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo- γ -pirona. Apresentam um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um heterociclo oxigenado (anel C) (**Figura 2**). Pode ser obtido por fontes alimentares específicas como vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes e sementes (BEHLING *et al.*, 2004).

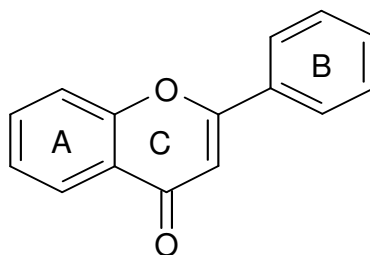


Figura 2. Estrutura básica dos flavonóides (Adaptado de BEHLING *et al.*, 2004).

Os flavonoides possuem diversas funções nas plantas, dentre elas, pode-se destacar a proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, ação antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES *et al.*, 2000; HARBORNE & WILLIAMS, 2000; HEIM *et al.*, 2002).

Mais de 6000 diferentes flavonoides já foram descritos (MARCHAND, 2002; YANG *et al.*, 2001). Podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas. As subclasses dos flavonoides são: chalconas, diidrocalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), diidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavandiols, antocianidina, isoflavonoides (genisteína, daizideína), bioflavonoides, proantocianinas e flavanol (catequina e epicatequina) (**Figura 3**) (BRAVO, 1998; PIETTA, 2000). As atividades bioquímicas dos flavonoides e de seus metabólitos dependem de sua estrutura química, que podem variar com substituições incluindo hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (COOK & SAMMAN, 1996).

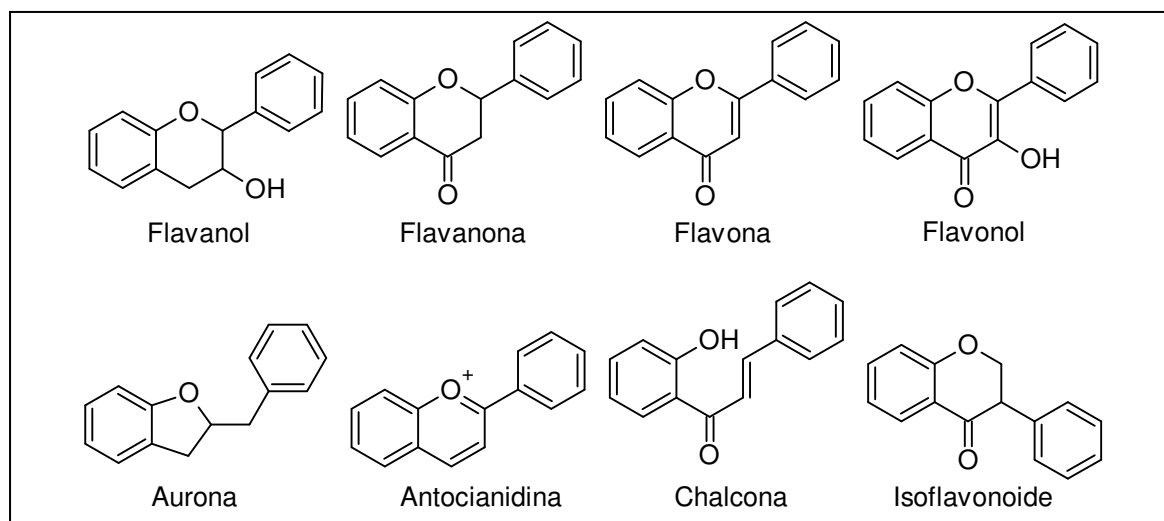


Figura 3. Estrutura básica de algumas subclasses de flavonóides (Adaptado de MARÇO *et al.*, 2008).

Os flavonoides são importantes componentes da dieta humana embora, geralmente, sejam considerados não nutrientes, ou seja, substâncias sem valor nutritivo (PIETTA, 2000). O consumo de alimentos ricos em polifenóis, incluindo os flavonoides, sua biodisponibilidade e os fatores interferentes vêm sendo amplamente estudados. A absorção intestinal e o metabolismo de alguns flavonoides não estão totalmente elucidados até o momento (BEHLING *et al.*, 2004).

Alguns compostos flavonoídicos têm sido investigados pela propriedade de diminuir a concentração sanguínea de lipídeos (MAGGIO, 1956; KATO & TOSA, 1983; JAHROMI & ANIL, 1993; NAGEM *et al.*, 1994; NAGEM *et al.*, 1995), de inibir aldose-reductase (CHAUDHRY *et al.*, 1983), fosfodiesterase (BERETTZ *et al.*, 1986), Ca⁺²-ATPASE (AUF'MKOLK *et al.*, 1981) e xantina oxidase (MOULIN *et al.*, 1994). Também tem sido demonstrada a capacidade de inibir as enzimas lipoxigenase (HOPE *et al.*, 1983) e ciclooxigenase (RATTY & DAS, 1988) que são enzimas responsáveis pela síntese dos eicosanoides, prostaglandinas e leucotrienos que são mediadores envolvidos na dor e inflamação.

3.7 Dor e nocicepção

Até a década de 60, no século passado, a dor era considerada uma resposta sensorial inevitável à lesão tecidual. As outras dimensões da experiência dolorosa, como componente afetivo, cognitivo, diferenças genéticas e ansiedade, eram pouco estudadas (GOZZANI, 2003).

A percepção de estímulos nociceptivos, denominada nocicepção, não é o mesmo que dor, que é experiência subjetiva e inclui um forte componente emocional (afetivo). A quantidade de dor que um estímulo particular produz depende de muitos outros fatores além do próprio estímulo. Uma sensação penetrante no peito causará muito mais dor se ela ocorrer espontaneamente num homem de meia idade do que se for causada por uma criança de dois anos pela pancada nas costelas com um objeto pontiagudo. O componente nociceptivo pode ser quase o mesmo, mas o componente afetivo é bastante diferente. Testes em animais com fármacos analgésicos geralmente medem a nocicepção e envolvem avaliação da reação de um animal a um estímulo medianamente doloroso, com frequência mecânico ou térmico. Tendo-se em vista a dificuldade de mensurar o componente emocional da dor em animais (RANG *et al.*, 2007).

Por ser uma experiência subjetiva é difícil definir a dor do modo exato mesmo pensando que todos saibam o que ela significa. Tipicamente é resposta direta a um evento desfavorável, associado a dano tecidual, como lesão, inflamação ou câncer, mas uma dor intensa pode surgir de modo independente de qualquer causa predisponente óbvia ou persistir por longo tempo, após a lesão precipitante ter sido curada (exemplo: dor de membro fantasma). Ela também pode ocorrer como consequência de lesão cerebral ou nervosa, como

a dor que ocorre de maneira espontânea, sem qualquer estímulo lesivo precipitante aparente, denominada dor neuropática, que tem sido reconhecida como particularmente importante. As condições da dor que não estão diretamente ligadas à injúria tecidual, são muito comuns e constituem uma importante causa de incapacidade e angústia; em geral elas respondem menos aos fármacos analgésicos convencionais do que nas condições em que a causa imediata é clara. Portanto, é útil distinguir dois componentes, um ou ambos podendo estar envolvidos nos estados dolorosos patológicos: o neurônio aferente nociceptivo periférico, que é ativado pelo estímulo lesivo (nociceptivo); os mecanismos centrais pelos quais as aferências geram uma sensação de dor (RANG *et al.*, 2007).

3.8 Mecanismos neurais da dor

Na dor por nocicepção, é importante identificar os transdutores de sinal (nociceptores), as vias que conduzem o sinal e como este podem ser moduladas tanto por via neural como através de substâncias endógenas e/ou exógenas (GOZZANI, 2003). Todos os membros do corpo são providos com terminações nervosas sensoriais que podem detectar toque, calor e dor aguda – sensações que são rapidamente transmitidas ao cérebro pelos nervos aferentes (BARTFAI, 2001).

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica em fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos (RAJA *et al.*, 1999). Estes nervos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânico, térmico, químico) (JULIUS & BASBAUM, 2001; JULIUS & McCLESKEY, 2006). Eles são distinguidos de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos pelo seu limiar mais alto, pois normalmente são ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva – suficiente para causar algum grau de lesão tecidual. Registros da atividade em fibras aferentes isoladas em humanos mostraram que estímulos suficientes para excitar estas pequenas fibras aferentes também evocam uma sensação dolorosa. Muitas dessas fibras são fibras C não-mielinizadas, com baixas velocidades de condução; este grupo é conhecido como nociceptores polimodais C. Outras são fibras mielinizadas finas (A δ) de condução mais rápida, mas que respondem a estímulos periféricos semelhantes. Embora haja algumas diferenças entre espécies, a maioria das fibras C nos nervos periféricos está associada com terminações nociceptivas polimodais. Os aferentes provenientes de músculos e vísceras também conduzem informação nociceptiva. Nos nervos destes tecidos, as fibras A δ estão

conectadas a mecanorreceptores de limiar alto, enquanto as fibras não-mielinizadas estão conectadas com nociceptores polimodais C, como na pele (OLIVEIRA, 2005).

Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual é a causa imediata da dor e isto resulta na liberação local de uma gama de agentes químicos que se supõe atuarem sobre as terminações nervosas ativando-as diretamente ou aumentando a sua sensibilidade a outras formas de estímulo. Diversos são os neuromediadores inflamatórios que, quando liberados de macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos lesionados, ativam os nociceptores nas fibras nervosas tipos A δ e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas (RIBEIRO *et al.*, 2002; KRAYCHETE *et al.*, 2006).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas espinais situam-se nos gânglios das raízes posteriores dos nervos raquidianos; as fibras penetram na medula através das raízes posteriores, terminando na substância cinzenta, nas seis lâminas do corno posterior da medula espinal. A maioria dos aferentes nociceptivos termina na região superficial do corno posterior, as fibras C e algumas fibras A δ inervando corpos celulares nas lâminas I e II, enquanto outras fibras A penetram mais profundamente no corno posterior (lâmina V). As células nas lâminas I e V dão origem às principais vias de projeção a partir do corno posterior tálamo (DICKENSON, 1995).

Os neurônios aferentes não-mielinizados contêm vários neuropeptídeos, particularmente a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP, *calcitonin gene-related peptide*). Estes são liberados como mediadores nas terminações centrais e periféricas e desempenham um papel importante na patologia da dor (CARVALHO & LEMONICA, 1998).

A dor aguda é geralmente bem explicada em termos de nociceção – um estímulo nociceptivo excessivo, dando origem a uma sensação intensa e desagradável. Por outro lado, a maioria dos estados de dor crônica está associada com aberrações da via fisiológica normal, originando a hiperalgesia (uma intensidade aumentada de dor associada com um estímulo nociceptivo brando), alodínea (dor evocada por um estímulo não-nociceptivo) ou dor espontânea sem qualquer estímulo precipitante (RANG, *et al.*, 2007).

No corno posterior a facilitação é bloqueada por antagonistas do receptor NMDA (*N-Metil-D-aspartato*), também pelos antagonistas da substância P (SP), um transmissor excitatório lento liberado por neurônios aferentes nociceptivos e por inibidores da síntese de óxido nítrico (NO). A SP produz resposta despolarizante lenta na célula pós-sináptica, que cresce durante a estimulação repetitiva e acredita-se aumentar a transmissão mediada pelo

receptor NMDA. Isto resulta em influxo Ca^{2+} e ativação da NO sintase, pela qual o NO liberado atua facilitando a transmissão. A substância P e o CGRP liberados dos neurônios aferentes primários também agem na periferia, promovendo inflamação por seus efeitos sobre os vasos sanguíneos e células do sistema imune. Este mecanismo, conhecido como inflamação neurogênica, atua para amplificar e manter a reação inflamatória e a paralela ativação das fibras aferentes nociceptivas (BLACK, 2002).

Há evidências de que esses processos também estão envolvidos na hiperalgesia patológica na qual se sabe que ocorre facilitação central. Outros mecanismos também podem contribuir para a facilitação central. O fator de crescimento do nervo (NGF, *nerve growth factor*), um mediador citocina-símile produzido pelos tecidos periféricos, particularmente na inflamação atua especificamente sobre neurônios aferentes nociceptivos, aumentando a sua excitabilidade elétrica, quimiossensibilidade e conteúdo peptídico e também promovendo a formação de contato sináptico. A produção aumentada de NGF pode ser um mecanismo importante pelo qual a transmissão nociceptiva torna-se facilitada pela lesão tecidual, levando a hiperalgesia. O NGF e outros mediadores inflamatórios causam aumento da expressão gênica em neurônios sensoriais; os genes assim sensibilizados incluem os que codificam para a formação de vários precursores neuropeptídicos, receptores e canais iônicos que tem o efeito global de facilitar a transmissão no primeiro contato sináptico no corno posterior (RANG *et al.*, 2007).

As células da lâmina II do corno dorsal (a substância gelatinosa, SG) são principalmente interneurônios inibitórios curtos que se projetam para a lâmina I e para a lâmina V e regulam a transmissão na primeira sinapse da via nociceptiva, entre as fibras aferentes primárias e os neurônios da transmissão do feixe espinotalâmico. Esta função de porteiro deu origem à expressão “teoria do controle da comporta”. De acordo com esta concepção, as células da SG respondem tanto à atividade das fibras aferentes que penetram na medula (assim permitindo a chegada de impulsos por um grupo de fibras aferentes para regular a transmissão de impulsos por outra via) quanto à atividade das vias descendentes. A SG é rica em peptídeos e receptores opioides e pode ser um importante sítio para a ação dos fármacos semelhantes à morfina (CARVALHO & LEMONICA, 1998).

A partir dos feixes espinotalâmicos, as fibras de projeção formam sinapse principalmente nas partes ventral e medial do tálamo, com células cujos axônios projetam-se para o córtex somatossensorial. Em particular, no tálamo medial, muitas células respondem de modo específico a estímulo nociceptivos periféricos, e lesões nesta área causam analgesia.

Estudos de imagem funcionais em indivíduos conscientes sugerem que o componente afetivo da sensação dolorosa envolve uma região específica do córtex cingulado (lesões do qual não impedem sensação de dor, embora possam alterar sua qualidade), distinta do córtex somatossensorial (RAINVILLE *et al*, 1997).

As vias descendentes constituem um dos mecanismos de comporta que controlam a transmissão do impulso no corno posterior (FIELDS & BASBAUM, 1994). Uma parte importante desse sistema descendente é a área cinzenta periaquedutal (CPA) do mesencéfalo, uma pequena área de substância cinzenta ao redor do canal central. Na década de 60 foi verificado que a estimulação elétrica desta área cerebral no rato causava analgesia suficientemente intensa, podendo ser executada cirurgia abdominal sem anestesia e sem originar qualquer resposta marcante. As sensações não dolorosas não foram afetadas. A CPA recebe aferências de muitas outras regiões cerebrais, incluindo o hipotálamo, córtex e tálamo e pensa-se representar o mecanismo pelo qual aferências corticais e outras atuam para controlar a “comporta” nociceptiva no corno posterior (CARVALHO & LEMONICA, 1998).

A principal via neuronal ativada pela estimulação da CPA corre primeiro para uma área do bulbo próxima da linha mediana, conhecida como *núcleo magno da rafe* (NMR), e daí através de fibras que ocorrem no funículo dorsolateral da medula espinhal, que fazem conexões sinápticas com interneurônios do corno posterior. O principal transmissor nessas sinapses é a 5-hidroxitriptamina (5-HT) e os interneurônios, por sua vez atuam inibindo o disparo dos neurônios espinotalâmicos. O próprio NMR recebe uma aferência dos neurônios espinotalâmicos, por meio do núcleo *reticular* paragigantocelular (NRPG) adjacente, de modo que este sistema inibitório descendente pode formar parte de uma alça reguladora de retroalimentação, pela qual a transmissão pelo corno posterior é controlada de acordo com a quantidade de atividade que alcança o tálamo (CARVALHO & LEMONICA, 1998).

3.9 Dor e inflamação

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos (agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo, lesão térmica ou outras lesões ocasionadas por agentes físicos e químicos). Em nível macroscópico, a resposta é habitualmente acompanhada dos sinais clínicos bem conhecidos como dor, calor, rubor, tumor e caso não haja uma resolução satisfatória do processo inflamatório pode ocorrer também a perda da função (ROCHA, 1978). As respostas

inflamatórias ocorrem em 3 fases distintas, sendo cada uma aparentemente mediada por diferentes mecanismos: (1) Uma fase transitória aguda, reação inata, não imunológica, que engloba os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos; caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar: (2) Uma fase subaguda tardia, caracterizada proeminentemente pela infiltração dos leucócitos e células fagocíticas; a resposta imune é adquirida e específica, tornando a resposta de defesa a um microorganismo invasor mais eficaz (TLASKALOVA- HOGENOVA *et al.*, 2005). (3) Uma fase proliferativa crônica, em que ocorre degeneração tecidual e fibrose. Existem muitos mecanismos diferentes envolvidos no processo inflamatório (GALLIN *et al.*, 1992; KELLEY *et al.*; 1993). A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência em vista dos patógenos e das lesões ambientais, embora, em algumas situações de doenças a resposta inflamatória seja exagerada e duradoura, sem qualquer razão benéfica aparente.

A reação inata envolve os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos e podem ser divididos em vasculares e celulares. Os eventos vasculares compreendem a vasodilatação, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo local, o aumento da permeabilidade vascular e a exsudação plasmática. Tais eventos são importantes na medida em que promovem um aumento local da concentração de mediadores de origem plasmática, entre eles os componentes do sistema complemento, da coagulação, do sistema fibrinolítico e das cininas. Concomitantemente, são desencadeados os eventos celulares, onde há a saída de leucócitos circulantes da luz do vaso e sua migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração (MUNRO, 1993; SPRINGER, 1994; WAHL *et al.*, 1996).

Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (SPRINGER, 1994; WEBER, 2003). A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamatório é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações fagocíticas e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. Também pode ocorrer, em processos inflamatórios, a migração de eosinófilos fator associado principalmente a processos alérgicos

e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (BROCHE & TELLADO, 2001). Toda essa transformação morfológica e funcional do tecido, característica dos processos inflamatórios, visa destruir, diluir ou isolar o agente lesivo, sendo, portanto, uma reação de defesa e de reparação do dano tecidual.

Os denominados mediadores inflamatórios são os responsáveis por esta gama de alterações bioquímicas e celulares, são moléculas solúveis e difusíveis produzidas principalmente por células inflamatórias (SHARMA & BUCHANAN, 1994).

3.10 Mediadores da dor e inflamação

Após o estímulo desencadeador do processo inflamatório, ocorre a liberação de diversos mediadores que podem originar-se do plasma, das células ou dos tecidos lesionados podendo ser divididos em: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas (sistema de cinina – bradicinina, sistema do complemento, sistema de coagulação-fibrinolítico); eicosanoides; proteases lisossômicas; fatores ativadores das plaquetas (PAF); quimiocinas, citocinas, óxido nítrico dentre muitos outros (KUMAR *et al.*, 2005; ALBERTINE *et al.*, 2004). Cada mediador com seu papel específico, atuando em estágios definidos da reação inflamatória (DE PAOLA, 1988). O entendimento dos mecanismos endógenos de ação de alguns importantes mediadores envolvidos na resposta inflamatória ajuda na compreensão e na busca de novos alvos terapêuticos para fármacos que atuem na resolução de processos patológicos que ocasionam dor e inflamação.

3.10.1 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas intermediárias que promovem interações entre células distanciadas. A IL-1 β , a IL-6 e o TNF α são pró-inflamatórias e induzem a produção de cada uma de forma sequencial e possuem ação sinérgica (WATIKINS *et al.*, 1999). Também, a administração exógena dessas substâncias induz dor e hiperalgesia (SOMMER & KRESS, 2004). A ligação da IL-1 β ao receptor IL1-RI inicia uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais, induzindo a expressão de COX-2, óxido nítrico sintetase e IL-1 β , a IL-6 e o TNF. Assim, a IL-1 β exerce ação direta e indireta nos nociceptores e há aumento da síntese de IL-1 β na lesão de nervo periférico (SUNG *et al.*,

2004; GILLEN *et al.*, 1998). A inflamação em qualquer parte do organismo causa um rápido, extenso e duradouro aumento nos níveis do mediador inflamatório IL-1 e 13 no fluido cerebrospinal, e que o bloqueio do receptor de IL-1 nas células do cérebro resulta em forte inibição da hipersensibilidade a dor (SAMAD *et al.*, 2001).

A IL-6 é sintetizada pelos mastócitos, monócitos, linfócitos, neurônios e células da glia. É considerado um mediador fundamental em várias etapas da inflamação, na etapa mais precoce possui efeitos quimioatraentes sobre os neutrófilos e na fase tardia na indução mitótica dos queratinócitos (GALLUCCI *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 1999).

Acredita-se que a IL-10 seja o mais importante mediador com papel limitador e finalizador da resposta inflamatória. Também regula o crescimento ou diferenciação de queratinócitos, células endoteliais e diversas células do sistema imune (MOORE *et al.*, 2001).

3.10.2 Cininas

As cininas mais ativas são a bradicinina e calidina, dois peptídeos intimamente relacionados produzidos em condições de lesão tecidual por clivagem proteolítica de uma proteína precursora contida no plasma (DRAY & PERKINS, 1993). São formadas no sangue e nos tecidos. A bradicinina age em receptores B1 e B2, sensibiliza nociceptores periféricos (desinibindo receptores vanilóides – TRPV1), potencializa a transmissão sináptica para glutamato na medula espinal, estimula macrófagos a liberar citocinas, secreta fatores quimiotáticos para neutrófilos e monócitos e facilita a liberação de histamina dos mastócitos. (WANG *et al.*, 2005).

A bradicinina é potente substância indutora da dor, agindo parcialmente pela liberação de prostaglandinas, que fortemente aumentam a ação direta da bradicinina sobre as terminações nervosas. A bradicinina atua ligando-se a receptores específicos acoplados à proteína G e produz os seus efeitos celulares pela produção de vários mensageiros intracelulares (CESARE & McNAUGHTON, 1997). Entre outras, suas ações incluem vasodilatação, incremento da permeabilidade vascular e a estimulação de células do sistema imunológico e neurônios sensoriais de modo a induzir dor (WALKER *et al.*, 1995). Os receptores de bradicinina estão acoplados à ativação de uma isoforma específica de proteína quinase C (PKC) que fosforila o VR1 e facilita a abertura do canal VR1, a ativação direta de nociceptores pela bradicinina ocorre nos receptores B levando à ativação de fosfolipase C e estimulação da proteína quinase C, aumentando a condutância da membrana celular a íons

sódio e despolarizando as fibras sensoriais. Além disso, a bradicinina também estimula a liberação de IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF- α) pelos macrófagos, poderosos estimuladores e amplificadores da resposta imune (WALKER *et al.*, 1995).

3.10.3 Taquicininas

Há três taquicininas endógenas - substância P, neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB) – que são amplamente distribuídas no sistema nervoso central (MAGGIO, 1988; MAGGI *et al.*, 1993). A substância P e a NKA, que derivam do mesmo gene, são encontradas especialmente nos neurônios aferentes primários nociceptivos e no corno posterior da medula. Os neurônios sensoriais nociceptivos expressam vários neuropeptídeos, que são liberados tanto nas terminações centrais como nas periféricas, quando os neurônios são ativados. A liberação dos peptídeos nas terminações periféricas destes neurônios como na “inflamação neurogênica” (HOLZER, 1988). As terminações contendo substância P são abundantes nas paredes de muitos vasos sanguíneos e também no sistema gastrointestinal, vias aéreas e pele.

Existem três subtipos de receptores de taquicinina: NK1, NK2, e NK3, sendo os agonistas preferidos a substância P, NKA e NKB, respectivamente. Todos são receptores acoplados à proteína G típicos atuando através de várias vias de tradução de sinal. A maioria dos efeitos conhecidos das taquicininas é mediada pelos receptores NK1 ou NK2 (SNIJDELAAR, 2000), com muita variação entre as espécies. Menos se conhece sobre os receptores NK3, e sua função parece ser mais limitada. A substância P, agindo sobre os receptores NK1 e a NKA agindo sobre os receptores NK2 originam potenciais sinápticos excitatórios muito lentos nos neurônios do corno posterior, que são insuficientes para por si só excitar os neurônios pós-sinápticos, mas podem aumentar durante atividade repetitiva para produzir uma salva de potenciais de ação que dura alguns segundos em resposta a cada estímulo. A inflamação pela ação do NGF aumenta o conteúdo de substância P nos neurônios nociceptivos e aumenta estas respostas excitatórias lentas na medula espinal, uma variação adaptativa que pode ser um fator importante na hiperalgesia (SNIJDELAAR, 2000).

As taquicininas promovem uma ampla variedade de respostas de células de muitos tipos, incluindo neurônios, músculos liso, endotélio vascular, células de glândulas exócrinas, mastócitos e células do sistema imunológico (MAGGI *et al.*, 1993), sendo padrão global dos efeitos semelhantes aos vistos com agentes como a bradicinina ou 5-HT. A maioria

dos tipos de músculo liso, incluindo os do sistema gastrointestinal e das vias aéreas, contrai-se em resposta as taquicininas. Os vasos sanguíneos mostram uma mescla de respostas constritoras e dilatadoras juntamente com a permeabilidade aumentada, levando a formação de edema. Muitos neurônios, incluindo centrais e autônomos, mostram resposta excitatória lenta. Aplicação intratecal da substância P causa resposta pruriginosa em animais conscientes e podem produzir hiperalgesia, consistente com o papel transmissor postulado da SP, na via nociceptiva. Os mastócitos são ativados e liberam histaminas e várias glândulas exócrinas, incluindo as salivares, são também estimuladas (MAGGI *et al*, 1993).

Há também evidências sugestivas que a substância P esteja envolvida não somente na via nociceptiva, mas também em condições inflamatórias, como artrite, asma, febre do feno e doença inflamatória do intestino, e também na enxaqueca (MAGGI *et al.*, 1993).

3.10.4 5-Hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina

A serotonina é um neurotransmissor sintetizado e liberado por neurônios do sistema nervoso central (gânglio da raiz dorsal, citoplasma e células de Schwann). Na periferia é liberada pelas plaquetas sanguíneas e mastócitos durante uma injúria tecidual pode promover a sensibilização ou ativação direta dos nociceptores e induz hiperalgesia por ação direta no aferente primário via receptor 5HT1A (HONG & ABBOTT, 1994).

3.10.5 Histamina

A liberação de histamina no foco inflamatório pode ser desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo da classe Imunoglobulina E (IgE), e pelos componentes C3a e C5a do sistema de complemento. Tais fatores promovem a degranulação dos mastócitos e basófilos por um grande número de mediadores inflamatórios, incluindo Substância P, Bradicinina e IL-1. Após sua liberação, a histamina atua nos neurônios sensoriais produzindo prurido em baixas concentrações e dor em concentrações mais elevadas. A superfície dos neurônios sensoriais, expressa receptores histamínicos, com posterior liberação da histamina ao meio extracelular. A histamina exerce a sua ação através de um efeito sobre receptores específicos, que são de três tipos principais: H₁, H₂ e H₃. Um quarto receptor de histamina também foi descrito posteriormente, sendo expresso no

tecido intestinal, no baço, no timo e em células imunes/inflamatórias, tais como neutrófilos, linfócitos T e eosinófilos (MONTENEGRO & FECCHIO, 1999; RANG *et al.*, 2007). Quando esses receptores são ativados levam a um aumento da permeabilidade de membrana a íons cálcio. Estes efeitos resultam na liberação de neuropeptídeos sensoriais, além das prostaglandinas e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) de células endoteliais, levando à indução de hiperalgesia e outros efeitos pré-inflamatórios (DRAY, 1995).

3.10.6. Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um radical livre, gasoso, inorgânico e incolor que é produzido a partir da L-arginina por uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS). A iNOS é a principal envolvida nas reações inflamatórias. Praticamente todas as células inflamatórias expressam à forma induzível a enzima em resposta a estimulação das citocinas. A NOS também é encontrada no epitélio brônquico de indivíduos asmáticos, na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa e nos sinoviócitos na doença articular inflamatória (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; DUSSE *et al.*, 2003).

O NO aumenta a concentração de GMPc intracelular, que medeia o relaxamento produzindo vasodilatação. A produção de NO é ativada pela entrada de Ca^{2+} no interior da célula. Além de promover o relaxamento da musculatura lisa possui ações principalmente pró-inflamatórias, trata-se de um potente vasodilatador que aumenta a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas pro-inflamatórias. O NO ou compostos dele derivados exercem ação citotóxica contra bactérias e fungos, vírus e parasitos metazoários, e acredita-se que o NO possa potencializar os mecanismos de defesa local. Todavia, quando produzido em excesso, pode ser prejudicial para as células dos hospedeiros. Entretanto, alguma de suas ações são antiinflamatórias, visto que, quando liberado de célula endoteliais, inibe a adesão dos neutrófilos e das plaquetas, bem como a agregação plaquetária (ROBBINS, 2000).

3.10.7 Fator de ativação das plaquetas (PAF)

O PAF, que também é conhecido como PAF-aceter e AGEPC (acetil-gliceril-éter-fosforilcolina), é um lipídio biologicamente ativo, que pode produzir efeitos em concentrações extremamente baixas. O termo “ativação das plaquetas” é incorreto, visto que possui ações

numa variedade de células-alvo diferentes, e acredita-se que seja um importante mediador nos fenômenos alérgicos e inflamatórios tanto agudos quanto persistentes (RANG, *et al.*, 2007).

Deriva de seu precursor, o acil-PAF, através da atividade da fosfolipase A2, resultando em liso-PAF, que, a seguir, é acetilado para produzir o PAF. Por sua vez, o PAF pode ser desacetilado a liso PAF. É produzido e liberado pela maioria das células inflamatórias, quando estas são estimuladas, e pelas plaquetas, com estimulação da trombina.

Ao atuar sobre receptores específicos, o PAF exerce uma ampla variedade de ações fisiopatológicas, e tem a capacidade de produzir muitos dos fenômenos da inflamação as ações farmacológicas do PAF consistem em vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para leucócitos (particularmente eosinófilos), ativação dos leucócitos, ativação e agregação das plaquetas e ação espasmogênica para a musculatura lisa (RANG, *et al.*, 2007).

Trata-se de um mediador em muitos tipos de inflamação, estando implicado na hiper-responsividade brônquica e na fase tardia da asma. As ações anti-inflamatórias dos glicocorticoides podem ser produzidas, pelo menos em parte, pela inibição da síntese do PAF (COLLINS, 1999).

3.10.8 Eicosanoides

Os eicosanoides são os metabólitos do ácido araquidônico e incluem as prostaglandinas, os tromboxanos e os leucotrienos. A biossíntese dos eicosanoides é regulada em resposta a estímulos físicos, químicos e hormonais. Essas alterações levam as células a adquirirem comportamentos diferenciados, movimentos novos, alterações de forma e liberação enzimática e de substâncias farmacologicamente ativas que possuem efeitos intracelulares importantes nos líquidos teciduais, tanto em condições fisiológicas como patológicas (MACHADO *et al.*, 2008). Como a concentração do araquidonato livre na célula é muito pequena, a biossíntese dos eicosanoides depende principalmente da sua disponibilidade para as enzimas que os sintetizam; essa disponibilidade depende de sua liberação a partir das reservas adiposas pelas hidrolases acíclicas, principalmente a fosfolipase A₂ e a lipase do diacilglicerol (MACHADO *et al.*, 2008).

Os leucotrienos são os produtos das vias das lipoxigenases. Essas enzimas solúveis localizam-se no citosol e são encontradas nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos. A 5-lipoxigenase atua sobre o araquidonato, produzindo ácido 5-

hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que é convertido em leucotrieno (LT) A₄. Por sua vez, o LTA₄ pode ser convertido em LTB₄ ou em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC₄, LTD₄ e LTE₄, que possui aminoácidos incorporados na sua estrutura (SAMUELSSON *et al.*, 1987). O LTB₄, ao atuar sobre receptores específicos, causa aderência quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (SAMUELSSON *et al.*, 1987).

Os cisteinil-leucotrienos provocam a contração do músculo brônquico, a vasodilatação na maioria dos vasos, porém provoca vasoconstrição coronária. O LTB₄ é um importante mediador em todos os tipos de inflamação; os cistenil-leucotrienos são particularmente importantes na asma (SAMUELSSON *et al.*, 1987).

O primeiro passo na síntese das PGs e dos tromboxano (TXs) é mediado pela enzima Ciclooxygenase (COX), a qual catalisa a incorporação de oxigênio ao ácido araquidônico, com subsequente formação de endoperóxidos cíclicos (FONSECA *et al.*, 2002). Esses endoperóxidos contribuem para alguns processos fisiológicos e patológicos, incluindo inflamação, tônus da musculatura lisa, hemostasia, trombose, parto e secreções gastrintestinais (FUKUDA *et al.*, 2003).

As prostaglandinas são produzidas no estágio inicial da lesão inflamatória, cuja ação leva à vasodilatação e à potencialização do efeito edematoso de outros mediadores, levando ao desenvolvimento de rubor, calor e edema no tecido inflamado (SCHAIBLE & SCHIMIDT, 1998) sozinhas não causam dor, mas potencializam o efeito produtor da dor de outros agentes, como a 5-HT ou bradicinina. As prostaglandinas das séries E e F são liberadas na inflamação e também durante a isquemia tecidual. Elas sensibilizam as terminações nervosas a outros agentes, em parte inibindo canais de potássio e em parte facilitando (através de reações de fosforilação medidas por segundos mensageiros) a abertura de canais de cálcio por agentes nociceptivos. A bradicinina causa a liberação de prostaglandina e assim exerce potente efeito “auto-sensibilizante” sobre os aferentes nociceptivos. Outros eicosanoides, incluindo a prostaglandina I₂ (PGI₂), os leucotrienos e os derivados instáveis do HETE (ácido hidroxieicosatetraenóico) podem também ser importantes. Os efeitos analgésicos dos fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) resultam da inibição da síntese de prostaglandinas (FARSAM *et al.*, 2000).

3.11 Considerações sobre fármacos analgésicos e anti-inflamatórios

Apesar da variedade de recursos existentes para o controle da dor, o tratamento medicamentoso ainda é a forma mais eficaz e simples, desde que conduzido de forma coerente e eficiente (OLIVEIRA, 2003).

Classicamente os medicamentos analgésicos são divididos em dois grupos: Analgésicos Anti-inflamatórios (Anti-inflamatórios Não-Esteroides - AINEs) e os Opioides (ou hipnoanalgésicos). Os primeiros, considerados erradamente como analgésicos “fracos” e de ação periférica, e os segundos, como analgésicos “fortes”, de ação central e com elevado risco de depressão respiratória e dependência. Os analgésicos centrais são muito efetivos em uma variedade de situações clínicas, porém podem ser responsáveis por uma série de efeitos que limitam sua utilidade clínica (CAPETOLA *et al.*, 1980). Na realidade, nem sempre os AINEs são “fracos”, nem os opioides atuam exclusivamente por via central ou necessariamente produzem depressão respiratória ou dependência, quando usados corretamente (OLIVEIRA, 2003). A principal limitação dos fármacos antiinflamatórios não esteroides clássicos reside na incidência de efeitos gástricos e renais (BRATER, 1999).

Os fatores que limitam o uso dos AINEs bem como o dos analgésicos opioides justificam as pesquisas voltadas para a descoberta de fármacos tão eficazes quanto estes consagrados analgésicos, porém mais seguros no que se refere aos efeitos adversos prejudiciais, para serem utilizados no tratamento da dor.

3.11.1 Analgésicos opioides

Os fármacos opioides são caracterizados por propriedade analgésica potente, efeito tranquilizante (sedativo) e hipnótico, e tendência a produzir tolerância, dependência psíquica e física, quando usados cronicamente (OLIVEIRA, 2003).

Medicamentos de ação primariamente central destacam-se pela intensa analgesia associada à depressão da consciência e das funções neurovegetativas. Utilizados no controle da dor aguda de grande intensidade, refratária aos anti-inflamatórios, e no controle da dor crônica de natureza neoplásica. Os opiáceos de baixa potência, como a codeína e o tramadol, apresentam efeito analgésico aditivo aos analgésico-anti-inflamatórios, sendo de grande utilidade na dor moderada à intensa (GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Os opiáceos interagem com receptores específicos dos peptídeos opioides (receptores opioides) distribuídos amplamente pelo sistema nervoso central e encontrados também nos

terminais nociceptivos. Pelo menos três tipos de receptores já foram identificados e clonados: mu (μ), delta (δ) e kappa (κ) (SCHUG, 2003).

Os receptores opioides pertencem à família dos receptores acoplados a proteína G e inibem a adenilato ciclase, reduzindo assim o conteúdo intracelular de AMPc. Todos os três subtipos de receptores exercem este efeito e também exercem efeito sobre canais iônicos através de um acoplamento direto da proteína G ao canal. Desta forma, os opioides promovem a abertura de canais de potássio e inibem a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, que são os principais efeitos vistos ao nível de membrana. Estes efeitos de membrana reduzem tanto a excitabilidade neuronal (pois a condutância aumentada ao K^+ causa hiperpolarização da membrana) como a liberação do transmissor (decorrente da inibição da entrada de Ca^{2+}). Portanto, o efeito global é inibitório ao nível celular. Contudo, os opioides aumentam a atividade em algumas vias neuronais por inibir o disparo de interneurônios inibitórios (DHAWAN *et al.*, 1996).

Os opioides ativam mecanismos inibitórios na Formação Reticular do Tronco Cerebral, na Medula Espinhal e no Sistema Límbico. Sua ação analgésica deve-se a: a) ativação de mecanismo inibitório descendente (sistema analgésico central) originário na região periaquedutal (PAG) e que, através de fibras noradrenérgicas originadas no *Locus Coeruleus* e fibras serotoninérgicas originadas no núcleo gigante-celular, exercem controle inibitório sobre as sinapses nociceptivas espinhais e reticulares; b) inibição direta da sinapse nociceptiva espinhal; c) inibição direta dos terminais nociceptivos (efeito local). Nas doses usuais, agem primeiramente em nível central, deprimindo o componente afetivo-emocional, inibindo a sensação aversiva, desagradável (sofrimento) da dor (GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Há também evidência de que os opiáceos inibem a descarga das terminações aferentes nociceptiva na periferia, particularmente em condições de inflamação, na qual é aumentada a expressão de receptores opioides pelos neurônios sensoriais. A injeção de morfina na articulação do joelho após a cirurgia fornece analgesia eficaz, o que pode comprovar que a analgesia opioide não é um fenômeno exclusivamente central (STEIN & YASSOURIDIS, 1997).

Apesar de seu efeito analgésico potente, sua utilização terapêutica é limitada por seus efeitos colaterais de risco, como dependência física, depressão da consciência (da sonolência ao coma), e depressão dos reflexos neurovegetativos, com hipotensão postural e depressão respiratória que pode variar da bradipnéia à apnéia. Outros efeitos indesejáveis e que limitam seu uso, como a constipação intestinal, náusea e vômito, sonolência, confusão mental e

retenção urinária, podem ocorrer. A depressão respiratória e a dependência física dependem do modo de administração, sendo normalmente resultado ou de overdose (iatrogenia), ou de administração prolongada superior a uma semana (OLIVEIRA, 2003).

Em virtude de seus efeitos colaterais de risco, mesmo nos casos em que sua indicação é absoluta, frequentemente, esses medicamentos são subutilizados. Como resultado dessa prática, muitos pacientes são privados do alívio que esses medicamentos podem propiciar (OLIVEIRA, 2003).

3.11.2 Anti-inflamatórios não-esteroides – inibidores da COX

Estima-se que, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 50 milhões de pessoas aplicam em torno de 5 a 10 bilhões de dólares por ano no consumo de anti-inflamatórios não esteroides (DUBOIS *et. al.*, 1998).

Os anti-inflamatórios não esteroides possuem propriedades analgésica, antitérmica, anti-inflamatória e antitrombótica (FUCHS & WANNMACHER, 1998), deve seus efeitos terapêuticos ao bloqueio da formação dos eicosanoides – inibição da produção de prostaglandinas (ERICKSON & FURST, 1998).

Os eicosanoides são formados a partir de determinados ácidos graxos polinsaturados (principalmente o ácido araquidônico) e incluem as prostaglandinas, a prostaciclina, o tromboxano A₂, fator de ativação das plaquetas (PAF). Os eicosanoides são extremamente prevalentes e já foram detectados em quase todos os tecidos e líquidos corporais. Sua produção aumenta em resposta a diversos estímulos, e eles produzem uma gama de efeitos biológicos. O ácido araquidônico encontra-se esterificado nos fosfolípidos da membrana celular. Quando ocorre estímulo lesivo qualquer, a fosfolipase A₂ é ativada e libera o ácido araquidônico para o citoplasma, que só vai dar origem às substâncias inflamatórias se estiver livre no citoplasma, pois serve de substrato para a produção de mediadores inflamatórios (RANG *et al.*, 2007; MORROW & ROBERTS II, 2007).

A produção desses mediadores se dá por duas vias distintas, a via das lipoxigenases que levará à síntese dos leucotrienos (LT) (SAMUELSON *et al.*, 1987; SIGAL, 1991), e a via da ciclooxigenase degrada o ácido araquidônico gerando prostaglandinas G (PGG) e H (PGH), que são endoperóxidos cíclicos, que dará origem a vários endoperóxidos como a prostaglandina E (PGE), prostaglandina F (PGF), prostacilinas (PGI) e tromboxano. A inibição da fosfolipase A₂ diminui a liberação do ácido graxo precursor e, dessa maneira, a

síntese de todos os metabólitos derivados dele, os glicocorticoides inibem a fosfolipase A2 indiretamente, atuando assim nas duas vias impedindo a formação tanto dos leucotrienos quanto das prostaglandinas (CAPETOLA *et al*, 1980).

A síntese das prostaglandinas é efetuada em etapas por um complexo de enzimas microsômicas. A primeira enzima nessa via de síntese é a prostaglandina endoperóxido sintase, também denominada ciclooxigenase de ácidos graxos. A COX, enzima chave que catalisa a biossíntese das prostaglandinas, também conhecida como Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase, foi isolada em 1976 e clonada em 1988. Em 1991 foi identificado um gene que codificava uma segunda isoforma da enzima, então denominada de ciclooxigenase-2 (CARVALHO *et al*, 2004).

Atualmente, sabe-se que existem três isoformas de ciclooxigenase, chamadas de ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2) e a ciclooxigenase-3 (COX-3) (BOTTING, 2000). A primeira (COX-1) é expressa constitutivamente na maioria das células, independente de estímulo lesivo, presente em condições fisiológicas principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 não é encontrada normalmente, mas pode ser induzida na presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e do fator α de necrose tumoral), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticoides, interleucina-4, interleucina-13 e interleucina-10, enquanto que a prostaglandina E2 (PGE2) promove regulação crescente (*up-regulation*) na expressão da COX-2 (CARVALHO *et al.*, 2004). A COX-3 possivelmente uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene dessa isoforma), encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao acetaminofeno (paracetamol) do que a COX-1 e COX-2. Postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual os fármacos analgésicos e antipiréticos do tipo AINEs desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre (CHANDRASEKHARAN *et al*, 2002).

Os anti-inflamatórios não-esteroides atuam inibindo a ciclooxigenase e, portanto a síntese de PGG2 e PGH2 e de todos os compostos derivados. Entretanto esses fármacos não inibem o metabolismo do araquidonato pelas lipoxigenases. Com efeito a inibição da ciclooxigenase pode, em tese, levar a um aumento na formação dos leucotrienos, aumentando a quantidade de araquidonato disponível para as lipoxigenases (PIPER, 1984).

A COX-1 e a COX-2 diferem quanto à sua sensibilidade à inibição por determinados anti-inflamatórios (VANE *et al.*, 1998). Os fármacos anti-inflamatórios não-esteroides que atuam de maneira não-seletiva atuam não só inibindo a COX-2, que é a ciclooxigenase predominante nos locais de inflamação, mas também a COX-1, que é uma enzima constitutiva e a sua inibição pode resultar em problemas gástricos, renais dentre outros (BRATER, 1999).

Essa observação levou ao estudo e desenvolvimento de agentes clinicamente úteis que inibem seletivamente a COX-2, que são anti-inflamatórios que não exibem muitos dos efeitos colaterais adversos dos inibidores não-seletivos da ciclooxigenase (PALMER, 2000).

Os inibidores seletivos para COX-2 foram desenvolvidos para amenizar as complicações gastrointestinais dos AINEs tradicionais. A descoberta de inibidores seletivos da isoforma COX-2 levou a obtenção da segunda geração de AINEs, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe, e outros denominados “Coxibes” (FITZGERALD & PATRONO, 2001; CARVALHO & LEMONICA, 2000). Entretanto, em 2004 o rofecoxibe foi retirado do mercado devido à constatação de efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio do processo homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e TXA₂ nas plaquetas (GROSSER *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

Apesar dos efeitos indesejáveis ocasionados pelos fármacos inibidores seletivos de COX-2, estudos demonstram que a inflamação crônica é um passo importante na etiologia do câncer e os inibidores de COX-2 têm sido estudados como agentes quimioprotetores contra o câncer (MARCHAND, 2002). A quimioprevenção com anti-inflamatórios inibidores de COX-2 é considerada um dos propósitos mais promissores na prevenção de cânceres humanos (SAKATA *et al.*, 2003). PAI *et al.*, (2002) demonstraram que (PGE₂) além de atuar no seu próprio receptor, estimula a produção de fatores de crescimento epidermal, potencializando o crescimento tumoral. A prostaglandina E₂ (PGE₂) pode induzir a angiogênese e aumentar a resistência das células a apoptose, o que enfatiza a promoção da carcinogênese pela COX-2 (FUKUDA *et al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos indicaram que, o uso de anti-inflamatórios em longo prazo, está associado a uma redução de 30 % a 50 % no risco de mortes causadas por câncer (RODRIGUEZ & HUERTA-ALVAREZ, 2004). Além disso, pesquisas sugerem que a duração e a consistência no tratamento com anti-inflamatórios são mais importantes que as dosagens utilizadas. Outros estudos epidemiológicos observaram uma associação entre o uso

de anti-inflamatórios e uma menor incidência de mortes causadas por câncer de esôfago, estômago, mama, pulmão, próstata, bexiga e ovário (MORAN, 2002; THUN *et al.*, 2002).

Na doença de Alzheimer todos os sinais de inflamação da microglia e ativação da astrogliia com deposição de proteína amilóide estão associados a patogênese da doença. Um evento crucial encontrado nesta doença é que a proteína β -amilóide é capaz de ativar a microglia, resultando na elevação da expressão neuronal de COX-2, potencializando o estresse oxidativo mediado pela proteína amilóide. Informações recentes sugerem que as prostaglandinas derivadas da COX-2 aumentam o processo inflamatório neurodegenerativo, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias nas células da astrogliia e potencializam a excitotoxicidade do glutamato acelerando a neurodegeneração. Os inibidores específicos da COX-2 podem oferecer importante alternativa na terapêutica profilática de redução da produção central de prostaglandinas nestes pacientes (DUBOIS *et al.*, 1998; HINZ & BRUNE, 2002; HULL *et al.*, 2000; HAWKEU, 1999).

3.12 Considerações sobre a atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória dos flavonoides

Os radicais livres podem ser definidos como qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, capaz de existência independente, dessa forma são altamente reativos e capazes de atacar biomoléculas. A formação desses compostos é determinada pela perda ou ganho de elétrons apresentando assim elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos dos diferentes átomos (MARRONI & MARRONI, 2002). A formação dos radicais livres ocorre durante os processos oxidativos biológicos, a partir de compostos endógenos (MARRONI & MORRONI, 2002) ou em circunstâncias patológicas incluindo envelhecimento, reações inflamatórias, câncer, desordens cardiovasculares, Alzheimer, mal de Parkinson, catarata e diabetes (CODY MIDDLETON & HARBORNE, 1986). Células corporais e tecidos são constantemente ameaçados por danos causados por radicais livres (GRACE, 1994; WALLE, 2004).

O mecanismo e a sequência de eventos pelos quais os radicais livres interferem na função celular ainda não são completamente entendidos, um dos mais importantes eventos parece ser a peroxidação lipídica que resulta em danos à membrana celular. Os ácidos graxos poli-insaturados, presentes nas membranas das células, podem ser oxidados por peroxidação enzimática ou auto-oxidativa, mediante reações que envolvam radicais livres. Um excesso de

radicais livres pode levar a reação em cadeia incontrolada e à peroxidação lipídica, resultando em patologias que incluem aterosclerose e câncer (COOK & SAMMAN, 1996).

A peroxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. No estágio de iniciação da peroxidação lipídica, ocorre interação do ácido graxo insaturado com o oxigênio, formando um radical lipídico. No estágio de propagação, o radical lipídico reage com oxigênio molecular, formando radical peroxila, que pode atacar outra molécula de lipídeo, formando mais radicais livres. No estágio de terminação, os radicais livres reagem com antioxidantes, formando produtos inertes. A peroxidação lipídica pode ser suspensa por inativação enzimática dos radicais livres pelos antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e, ou, aceleram o estágio de terminação (COOK & SAMMAN, 1996). Sabe-se que a peroxidação lipídica está intimamente relacionada com processos inflamatórios. Esses danos celulares causam troca na carga líquida da membrana provocando mudanças de pressão osmótica que resultam em lise celular. Radicais livres podem agir sobre vários mediadores inflamatórios contribuindo para uma inflamação geral responsável por danos aos tecidos (NIJVELDT, 2001).

Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos (KADASWAMI & MIDDLETON, 1994) protegendo assim os tecidos dos agentes oxidantes e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido (O^{2-}), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (GALATI *et. al.*, 2002).

Surgem alguns requisitos na estrutura química dos flavonoides possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercidas por esta classe de compostos, sendo eles o grupo carbonila, em C-4, e a dupla ligação, entre C-2 e C-3. Além disso, o padrão de substituição no anel B é determinante no processo de eliminação dos radicais livres (HARBORNE & WILLIAMS, 2000). A atividade antioxidante de um flavonoide é então determinada pelo anel B, enquanto que a estrutura base restante tem apenas uma pequena influência. Isto se deve a uma maior capacidade doadora de elétrons deste anel, havendo uma maior influência do restante da estrutura base com o decréscimo de atividade antioxidante do anel B (SILVA *et al.*, 2002). O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula torna-se um fator que contribui também de forma significativa para a atividade

antioxidante destes compostos (HEIM *et al.*, 2002). Em termos gerais o fator que determina a atividade antioxidante de um dado flavonoide será a estabilidade redox do radical formado a partir do flavonoide original (MARTINÉZ-FLORES, 2002).

As diferenças na atividade antioxidante de flavonoides por poliidroxilação ou polimetoxilação ocorrem, provavelmente, devido a diferenças nas configurações estruturais dos radicais livres. Após a doação de grupos hidroxila e metila pelos flavonoides esses radicais livres perdem sua reatividade, dessa forma não são capazes de atacar biomoléculas do organismo (HEIM *et al.*, 2002).

Investigações bioquímicas dos mecanismos da ação dos flavonoides têm mostrado que esses compostos inibem uma ampla variedade de sistemas enzimáticos. O ácido araquidônico é um importante ácido graxo que serve como precursor de eicosanóides os quais são potentes mediadores intracelulares, que controlam uma variedade de processos complexos no organismo. No passo intermediário da formação desses compostos, prostaglandina endoperóxidos (PGH₂ e PGG₂ são formados pela ação da enzima prostaglandina endoperóxido sintetase, uma enzima com atividade de ciclooxigenase (produzindo PGG₂ a partir de ácido araquidônico) e peroxidase (produzindo PGH₂ a partir de PGG₂). Durante a atividade de peroxidase, radicais livres orgânicos são produzidos, os quais dão origem à formação de intermediários reativos de oxigênio e peroxidação lipídica patológica (GALVEZ *et al.*, 1995). A propriedade apresentada pelos flavonoides em inibir tanto a via da ciclooxigenase quanto da 5-lipoxigenase no metabolismo do araquidonato pode contribuir para propriedades anti-inflamatórias. Além disso, estudos têm mostrado que flavonoides aumentam a permeabilidade capilar e exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos. (SILVA *et al.*, 2002).

HOPE *et al.* (1983), demonstraram que alguns flavonoides podem inibir a ciclooxigenase e lipoxigenase, impedindo a formação das prostaglandinas e leucotrienos e diminuindo com isto a formação de processos inflamatórios (**Figura 4**). LEE *et al.* (1982) mostraram a inibição destas enzimas pela quercetina. Certos flavonoides podem possuir ação anti-inflamatória por causar inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase. (MUTOH *et al.*, 2000; RASO *et al.*, 2001). O mecanismo de inibição exercido pelos flavonoides sobre as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase está sendo extensivamente pesquisado (NIJVELTD *et al.*, 2001). Este mecanismo pode estar relacionado à opressão da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase) (BEHLING *et al.*, 2004).

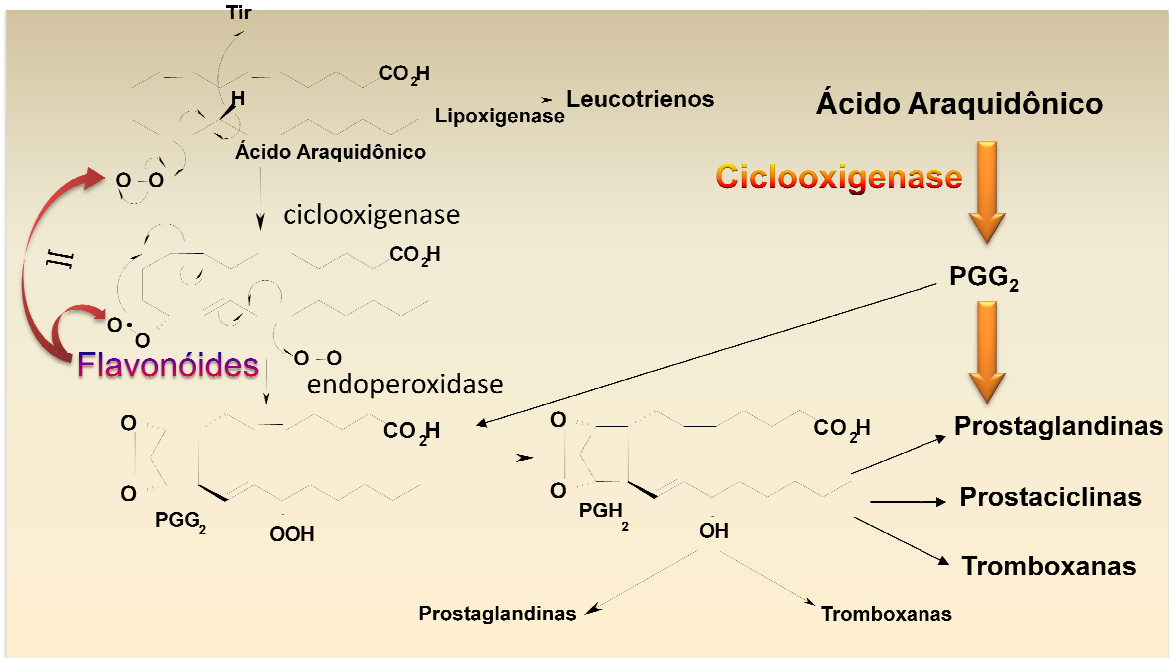


Figura 4. Inibição da formação de eicosanóides através do seqüestro de radicais livres pela ação dos flavonóides antioxidantes. (Adaptado de BEHLING *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2004)

Flavonóides como a quercetina e a luteolina (**Figura 5**) podem reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória (FRIESENECKER *et al.*, 1995). Alguns flavonóides são responsáveis também pela inibição de processos mitogênicos, interações célula-célula, incluindo possíveis efeitos na adesão molecular (NIJVELTD *et al.* 2001).

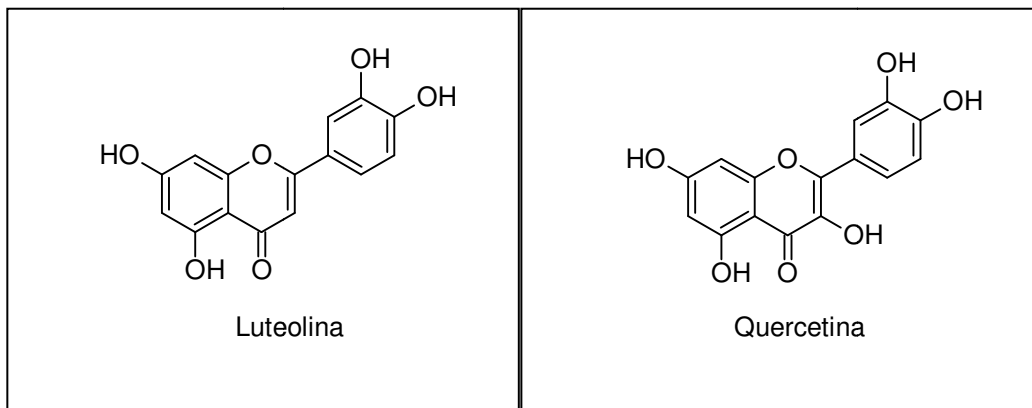


Figura 5. Estruturas químicas: Luteolina e Quercetina (Adaptado de ALVES *et al.*, 2007)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material botânico

A casca do caule da espécie *Ximenia americana* L. foi coletada em abril de 2002 no município de Campo Maior- PI. Sendo a identificação da espécie realizada pela Dra. Maria Edilene Alencar. Uma exsicata da planta foi depositada sob o número TEPB 14407 no Herbário Grasiela Barroso da Universidade Federal do Piauí.

4.2 Extração e fracionamento da planta

A casca do caule (3,3 kg) da *X. americana* L. foi coletada, separada e seca à temperatura ambiente ($26^{\circ}\text{C} \pm 1$) ao abrigo da luz, trituradas em moinho tipo forrageira (Nogueira Itapira – SP, mesh 2 mm), e extraída com etanol 95 %, por 3 vezes consecutivas em um extrator de aço inoxidável a temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 1$. Após concentração em evaporador rotatório a baixa pressão e eliminação da umidade residual por liofilização, foi obtido o extrato etanólico da casca do caule (620 g, 18 %).

O extrato etanólico da casca do caule (500 g) da *X. americana* L. foi suspenso em mistura de MeOH/H₂O (2:3) submetido a processo de partição líquido-líquido sucessivamente com C₆H₁₄ (3 x 700 mL), CHCl₃ (3 x 700 mL) e AcOEt (3 x 700 mL). Após remoção do solvente à baixa pressão em evaporador rotatório e liofilização da fração hidrometanólica foram obtidas quatro frações do extrato da casca do caule: C₆H₁₄ (10,75 g; 1,7 %), CHCl₃ (7,2 g; 1,2 %), AcOEt (220 g; 45 %) e MeOH/H₂O (240,4 g; 48 %). O extrato bruto em EtOH e frações resultantes da partição foram submetidas a ensaios da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* e antioxidante *in vitro*.

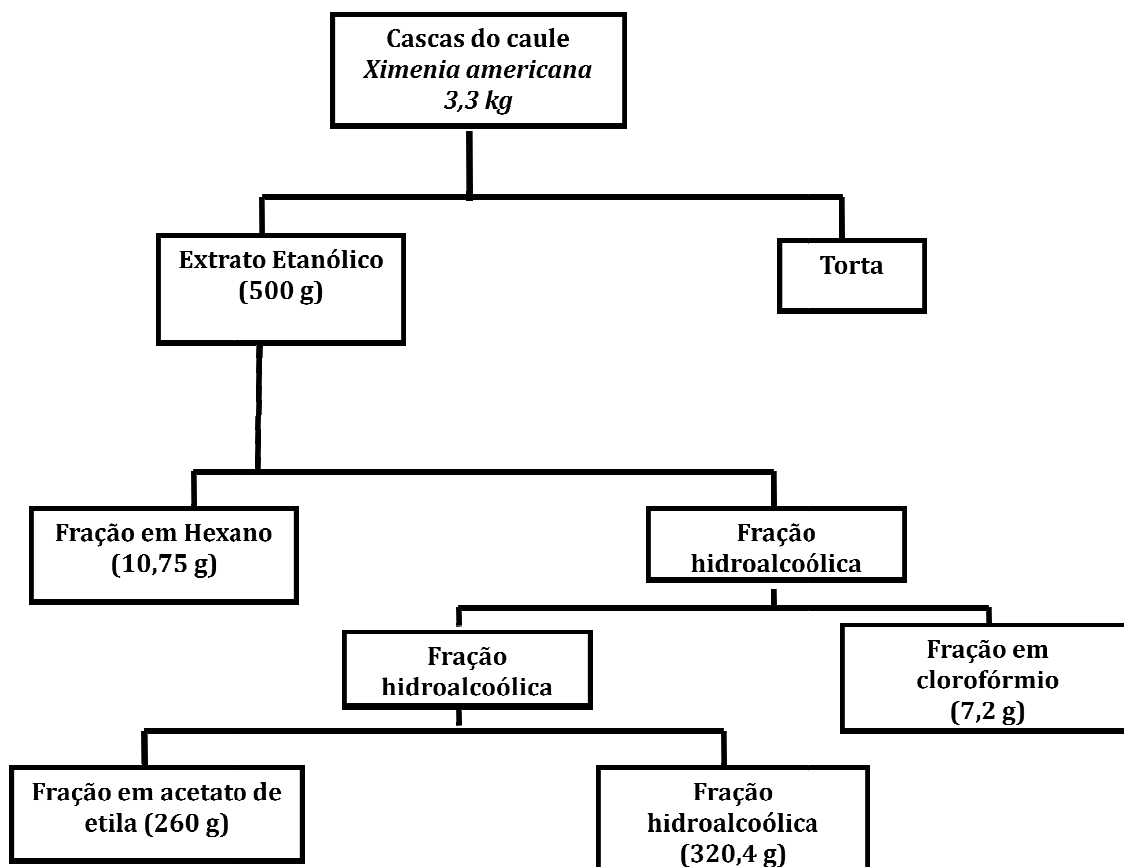


Figura 6. Organograma da obtenção e fracionamento do extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* L.

4.3 Isolamento fitoquímico

A fração em acetato de etila (200,0 g) da casca do caule, foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel desativada com água a 10 % (800 g) eluída com acetato de etila e metanol (**Figura 7**). Foram obtidas três subfrações pela passagem de 1000 mL de cada solvente para cada fração: **C1**-AcOEt (46,54 g, 23,2 %), **C2**-AcOEt (29,11 g, 14,5 %) e **C3**-MeOH (76,66 g, 38 %).

Uma alíquota da subfração **C1**-AcOEt (40,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna de gel de sílica (300 g). Foram coletadas 7 frações de 500 mL empregando-se como eluentes CHCl_3 , MeOH e misturas destes.

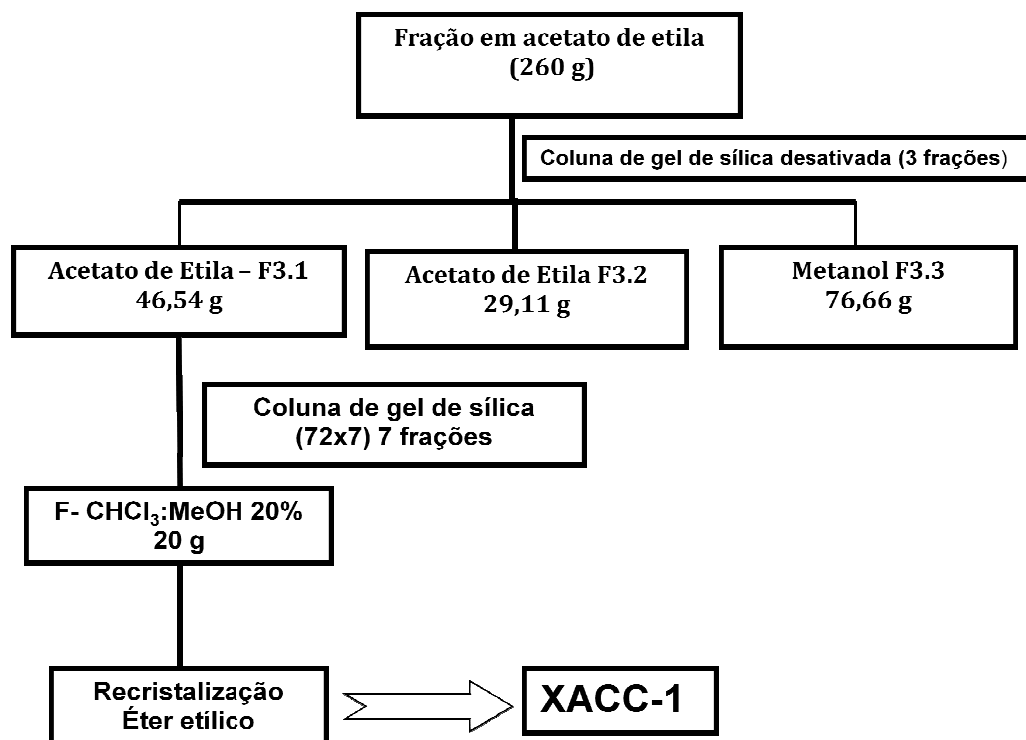


Figura 7. Organograma do isolamento fitoquímico da XACC-1

A fração CHCl₃:MeOH 20 % (17 g, 42,5 %) forneceu, após remoção do solvente, um sólido amorfo de cor vinho. Parte deste material (3,5g) foi submetida, a um processo de recristalização em éter etílico e acetato de etila 1:1, por três vezes consecutivas fornecendo a epicatequina XACC-1 (1 g, 28 %) (**Figura 8**). Todas as etapas referentes ao estudo fitoquímico foram realizadas pela aluna de Doutorado Valdiléia Uchôa no LPqRN da UFAL sob a orientação do Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart de Sant'Ana que é co-orientador deste trabalho.

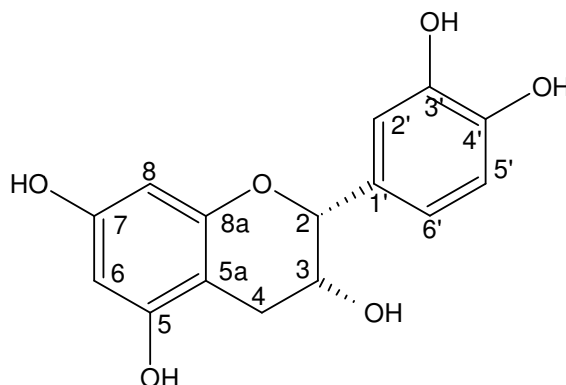


Figura 8. Estrutura química da epicatequina XACC-1 isolada da casca do caule da *X. americana* L.

4.4 Extratos, Frações e Substâncias Utilizadas

Nos ensaios foram utilizados: o extrato etanólico; as frações, aquosa, hexânica, clorofórmica, acetato de etila e a epicatequina XACC-1, substância isolada da fração acetato de etila. Todos obtidos a partir da casca do caule da *X. americana* L. Como fármacos padrão foram utilizados: dipirona (Sigma Aldrich), indometacina (Merck), morfina (Dimorf-Cristalia-BR). Em todos os experimentos, as substâncias, extratos e fármacos foram administrados em uma suspensão de Tween 80 (Sigma Aldrich) e água destilada (0,05%) por via intraperitoneal (i.p.).

4.5 Modelos experimentais *in vivo*

4.5.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (25-35 g) machos ou fêmeas, adultos, com 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério Central da UFAL. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas). Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAL (Protocolo nº 006443/2005-78). Após a utilização nos experimentos, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

4.5.2 Toxicidade aguda aproximada (AKKOL et al., 2008)

Os camundongos foram tratados com o extrato etanólico e frações (clorofórmica, hexânica, acetato de etila e aquosa) com a dose de 500 mg/Kg (dose cinco vezes maior que a habitualmente utilizada nos demais ensaios). Os compostos foram administrados por via intraperitoneal em uma suspensão de Tween 80 e água destilada (0,05 %). Os animais foram observados por um período de 72 h, sendo a morbidade e mortalidade registradas até o fim do período.

4.5.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER *et al.*, 1959, COOLIER *et al.*, 1968)

O perfil antinociceptivo foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Quarenta minutos após o tratamento com o extrato etanólico, frações (clorofórmica, hexânica, acetato de etila e aquosa), a epicatequina (XACC-1) e o fármaco padrão dipirona (todos na dose de 100 mg/Kg exceto a epicatequina e a dipirona que foram utilizadas na dose de 100 μ mol/Kg pela via intraperitoneal), foi realizada a administração do ácido acético 0,1 N (0,1 mL/10 g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Cinco minutos após a injeção do agente flogístico, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Para a obtenção da curva dose resposta as doses utilizadas para a dipirona e epicatequina foram: 1, 10, 100 e 300 μ mol/Kg.

4.5.4 Teste da formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1987, TJOLSEN *et al.*, 1992)

Neste modelo os animais receberam uma injeção de 20 μ l de uma solução de formalina 2,5 % (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com o extrato etanólico, frações (clorofórmica, hexânica, acetato de etila e aquosa), a epicatequina (XACC-1) e o fármaco padrão indometacina (todos na dose de 100 mg/Kg exceto a epicatequina e a indometacina que foram utilizadas na dose de 100 μ mol/Kg pela via intraperitoneal). Registrou-se o tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo a pata (resposta ao estímulo doloroso). Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: primeira fase - primeiros cinco minutos e segunda fase - 15-30 minutos após a injeção. A porcentagem de inibição da resposta foi calculada pela comparação com os animais controles e as fases respectivamente correlacionadas à dor neurogênica e a dor inflamatória.

4.5.5 Ensaio da placa quente (*hot plate test*) (KURAIISHI *et al.*, 1983)

A atividade antinociceptiva central foi avaliada através do teste da placa quente. Os animais foram colocados sobre a placa aquecida ($55 \pm 0,1$ °C) e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida das patas traseiras ou dianteiras) foram cronometradas. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-

off” (máximo de permanência do animal na placa) de 10 segundos. Posteriormente, o extrato etanólico, frações (clorofórmica, hexânica, acetato de etila e aquosa), a epicatequina (XACC-1) e o fármaco padrão morfina (todos na dose de 100 mg/Kg exceto a epicatequina que foi utilizada na dose de 100 µmol/Kg e a morfina utilizada na dose de 15 µmol/Kg) pela via intraperitoneal. Após um intervalo de 30 minutos, novas medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas.

4.5.6 Ensaio de peritonite induzida por zymosan A (LEITE *et al.*, 2007)

Os camundongos foram tratados com o extrato etanólico, frações (acetato de etila e aquosa), a epicatequina (XACC-1) e o fármaco padrão indometacina (todos na dose de 100 mg/Kg, exceto a epicatequina e a indometacina que foram utilizadas na dose de 100 µmol/Kg pela via intraperitoneal), após 30 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração intraperitoneal de 0,5 mL de uma solução de Zymosan A (Sigma) (2 mg/mL). Após 6 h da injeção de Zymosan A, a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de Ca²⁺ e Mg²⁺). Em seguida realizou-se a análise do lavado peritoneal (2 mL) e contagem total do número de células, feita em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio ótico em objetiva de 40x. Após a contagem de células totais, foram preparadas lâminas do lavado peritoneal, as quais foram fixadas com metanol e coradas com panótico rápido.

4.5.7 Ensaio de peritonite induzida por carragenina (FERRANDIZ & ALCARAZ, 1991)

Os camundongos foram tratados com o extrato etanólico, frações (clorofórmica, hexânica, acetato de etila e aquosa), a epicatequina (XACC-1) e o fármaco padrão indometacina (todos na dose de 100 mg/Kg exceto a epicatequina e a indometacina que foram utilizadas na dose de 100 µmol/Kg pela via intraperitoneal), após 30 minutos foram submetidos ao ensaio de peritonite, por administração intraperitoneal de uma solução de Carragenina (1 % em salina; 250 µl/animal). Após 4 h da injeção de Carragenina a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de Ca²⁺ e Mg²⁺). Em seguida realizou-se a análise do lavado peritoneal e contagem total do número de células. A contagem foi feita em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio ótico em objetiva de

40x. Após a contagem de células totais, foram preparadas lâminas do lavado peritoneal, as quais foram fixadas com metanol e coradas com panótico rápido.

4.6 Modelos Experimentais *in vitro*

4.6.1 Determinação de fenóis totais (BONOLI et al., 2004; SOUSA et al., 2007)

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de extrato etanólico da *X. americana* L. foi feita por meio de espectroscopia na região do visível pelo método espectrofotométrico usado o reagente de Folin-Ciocalteu com modificações. O extrato etanólico (100 mg) foi dissolvido em metanol, transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL; esta segunda solução teve seu volume acertado novamente com metanol. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. A solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos o extrato.

O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $C = 809,0200A + 5,0827$, onde C é a concentração do ácido gálico, A é a absorbância a 750 nm e coeficiente de correlação $R = 0,999$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.6.2 Análise quantitativa da atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998)

A avaliação quantitativa da atividade sequestrante de radical foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de

soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 516 nm, tendo como controle positivo a rutina.

4.6.3 Construção da curva de calibração do DPPH

Primeiramente, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 516 nm de todas as soluções (1 a 40 µg/mL), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 min entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi $C = 35,846A - 0,230$, onde C corresponde à concentração de DPPH no meio, A é a absorbância medida no comprimento de onda de 516 nm e o coeficiente de correlação $R = 0,9997$.

4.6.4. Leitura das medidas de absorbância nas amostras

Soluções do extrato etanólico, frações e substância isolada (500 µg/mL) e do controle positivo em metanol foram diluídas nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 516 nm, no 1º, 5º e 10º min, a cada 10 min até completar 1 h. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução metanólica do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$$

onde $[DPPH]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com as amostras e $[DPPH]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL (100 µmol/mL) (BRAND-WILLIAMS, 1995; SÁNCHEZ-MORENO, *et al.*, 1998; SOLER-RIVAS *et al.*, 2000).

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}) (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998). Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em percentual de inibição do DPPH (PI), determinada pela equação:

$$PI = \{ [Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100 \} / Abs_{DPPH}$$

onde Abs_{DPPH} é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Abs_{amostra} é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra) (YEN & DUH, 1994; SOUSA *et al.*, 2007).

4.7 Análise Estatística

Nos estudos *in vivo* os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foi realizado utilizando o teste *t* de Student ou ANOVA seguido de teste de Dunnet. Os valores foram considerados significativos quando **p* < 0,05 e ***p* < 0,01. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média, conforme indicado nas legendas das tabelas e figuras. As análises foram realizadas no GraphPad Prism® versão 3.0. Os resultados apresentados dos estudos *in vitro* correspondem à média de três repetições (n=3) ± desvio padrão da média. Os valores foram considerados significativos quando **p* < 0,05. Aplicando-se ANOVA, seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. As análises foram realizadas usando o programa Microcal Origin 7.5 e SPSS 9.0.

5. RESULTADOS

5.1 Toxicidade aguda aproximada (AKKOL *et al.*, 2008)

Devido ao corrente uso para fins medicinais e alimentícios por parte de diversas populações do mundo da *Ximenia americana* L. a avaliação da toxicidade aguda do extrato, frações e da XACC-1 desta espécie é de fundamental importância. Foi verificado durante a monitoração dos animais nas 72 h subsequentes a administração de uma dose única de 500 mg/Kg, i.p. que: a fração acetato induziu a morte de 100 % dos animais após 48 h do experimento. Não houve morte dos animais tratados com a fração hexânica e o extrato etanólico. A fração clorofórmica e a fração aquosa induziram a morte de 75,0 % e 25,0 % dos animais respectivamente. Através destes resultados pode-se afirmar que o extrato etanólico e a fração acetato de etila de *X. americana* L. apresentam uma toxicidade na dose de 500 mg/Kg. Devido a pouca quantidade da XACC-1 não foi possível verificar a toxicidade aguda desta substância na dose de 500 µmol/Kg, no entanto os animais foram monitorados durante todos os ensaios realizados na dose de 100 µmol/kg, chegando a dose de 300 µmol/Kg quando realizou-se a DE₅₀ no ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético onde não foram constatados sinais de toxicidade desta substância nestas doses.

5.2 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER *et al.*, 1959, COOLIER *et al.*, 1968)

Inicialmente o extrato etanólico, a fração aquosa, fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato e o flavonoide epicatequina (XACC-1), isolado da fração acetato, foram suspensos em goma arábica e submetidos ao ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético utilizando-se a administração por via oral. Os resultados mostraram que o extrato, as frações e a substância isolada não possuíam atividade por esta via (dados não mostrados). De posse destes resultados, todos os ensaios posteriores foram realizados utilizando-se apenas a via intraperitoneal.

Os resultados mostrados na **Figura 9** sugerem que o extrato etanólico, todas as frações testadas e a XACC-1, foram significativamente ativas ao inibir o número de contorções abdominais em camundongos na dose de 100 mg/Kg i.p. para os extratos e frações e de 100 µmol/Kg i.p. para a epicatequina e dipirona, utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparadas com os animais que receberam apenas o veículo (Tween 80 e água destilada).

Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,01$. O efeito inibitório foi de: fração aquosa 95,5 %, extrato etanólico 98,2 %, fração hexânica 92,3 %, fração clorofórmica 99,5 %, fração acetato 95,0 %, e XACC-1 98,5 %. O fármaco padrão (dipirona) foi capaz de inibir o número de contorções abdominais em 85,6 %. Portanto, os resultados mostram que o extrato etanólico, todas as frações e a epicatequina XACC-1 induzem atividade antinociceptiva.

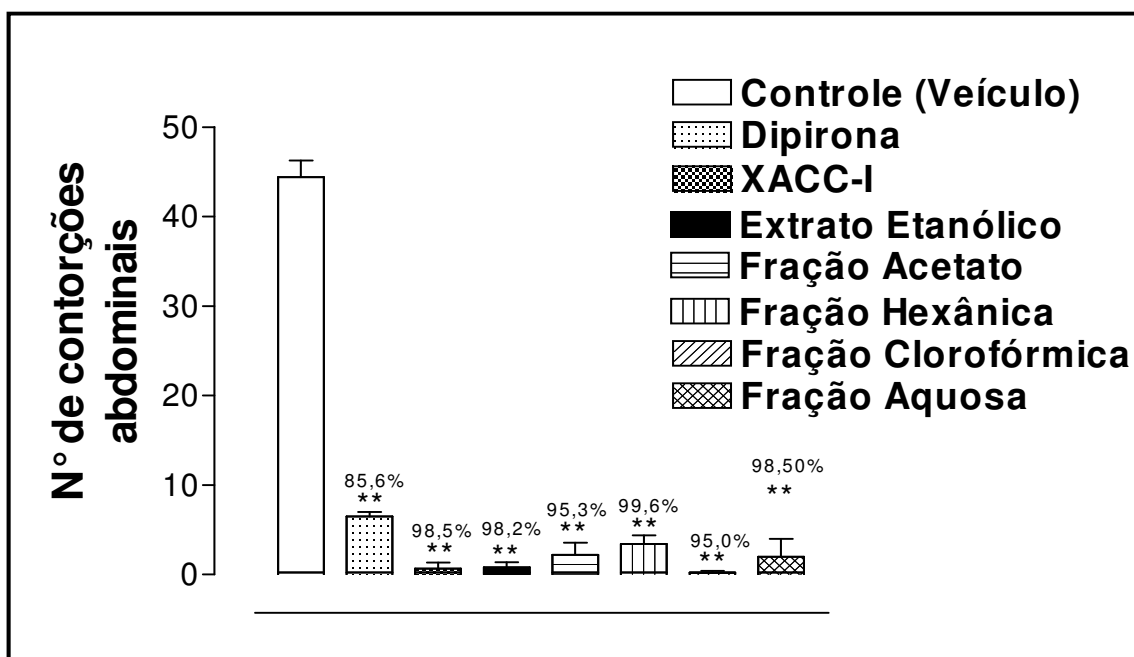


Figura 9. Efeito da epicatequina XACC-1, extrato etanólico e frações da casca do caule de *X. americana* L. em ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (n=6). (** $p < 0,01$).

Ainda utilizando o ensaio de contorções abdominais foi realizada a curva dose-resposta da XACC-1 (1–300 $\mu\text{mol/Kg}$). A XACC-1, por via i.p., inibiu o número de contorções abdominais com valor de $DE_{50} = 32,0 \mu\text{mol/Kg}$, limite de confiança 95 %: 10,7 – 117,8 $\mu\text{mol/Kg}$. Para uma comparação com o fármaco padrão a DE_{50} da dipirona foi também calculada em 29,3 $\mu\text{mol/Kg}$, limite de confiança 95 %: 22,7 – 75,4 $\mu\text{mol/Kg}$ (**Tabela 1**).

Tabela 1. Potência e eficácia da dipirona e da XACC-1 no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

Substâncias	DE ₅₀	Efeito Máximo
DIPIRONA	29,3 µmol/kg	83,5 %
XAAC-1	32,0 µmol/kg	99,6 %

Número de animais (6); *p<0,05 (teste t-Student)

5.3 Ensaio de nociceção induzida por formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1987, TJOLSEN *et al.* 1992)

Com o objetivo de avaliar melhor a resposta antinociceptiva neurogênica e inflamatória, submetemos o extrato etanólico, fração aquosa, fração hexânica, fração clorofórmica, fração acetato de etila e a epicatequina (XACC-1) da *X. americana* L. ao ensaio de nociceção induzida por formalina na dose de 100 mg/Kg i.p. para os extratos e frações e de 100 µmol/Kg i.p. para a XACC-1 e indometacina. Neste modelo, os resultados indicam que a fração clorofórmica mostrou-se ativa ao inibir a primeira fase do ensaio que está relacionado à dor neurogênica, com porcentagem de inibição de 31,5 %. O extrato etanólico e as demais frações não apresentaram porcentagens estatisticamente significativas nesta primeira fase do experimento (**Figura 10A**). A XACC-1 foi capaz de inibir o número de lambidas da pata do animal tanto na primeira quanto na segunda fase com porcentagens de 64,2 % e 86,8 % respectivamente (**Figura 10A e 10B**), apresentando porcentagem de inibição superior a do fármaco utilizado como padrão (indometacina) que inibiu em 49,9 % o tempo delambida da pata do animal na segunda fase do experimento. O extrato etanólico e a fração aquosa foram capazes de inibir a segunda fase do ensaio apresentando porcentagens de inibição superiores a da indometacina, que foram de 82,4 % e 73,7 % para o extrato etanólico e fração aquosa respectivamente, porcentagens tão expressivas quanto a induzida pela epicatequina XACC-1 (86,8 %) (**Figura 10B**).

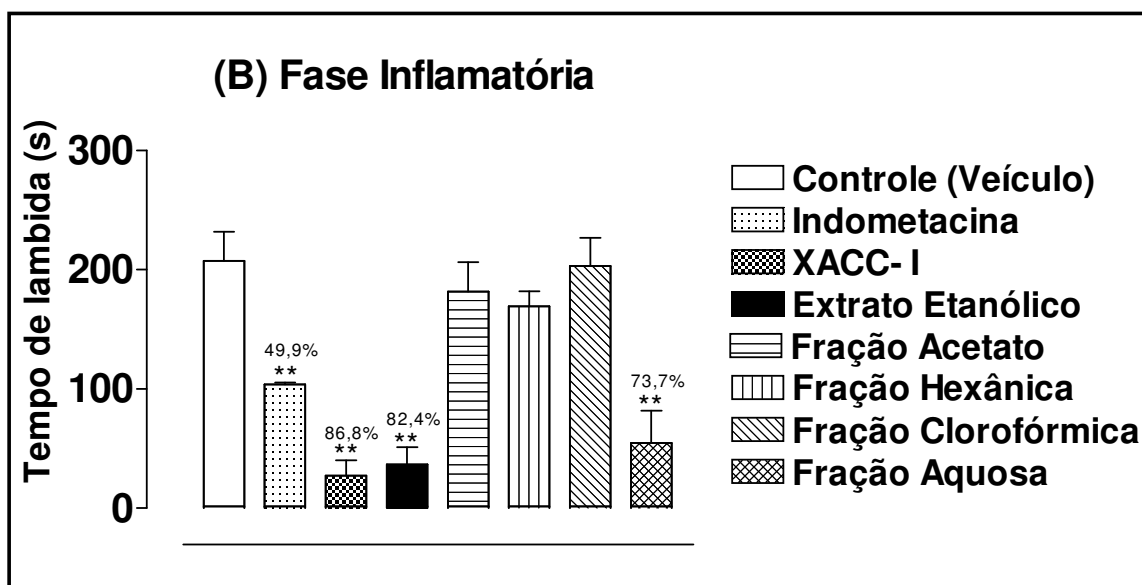
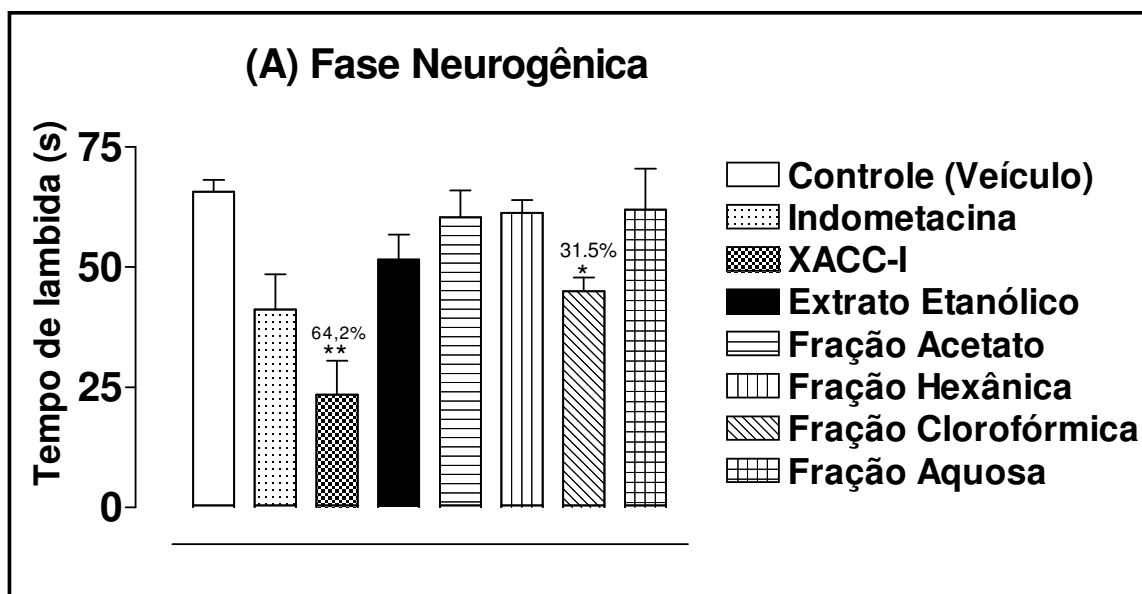


Figura 10. Efeito da epicatequina XACC-1 (100 $\mu\text{mol/Kg}$ i.p.), do extrato etanólico e frações (100 mg/Kg i.p.), da casca do caule de *X. americana* L., em ensaio de nocicepção induzida por formalina **A** - Fase neurogênica. **B** – Fase inflamatória. Os resultados representam à média \pm E.P.M. (n = 6). (* p < 0,05; ** p < 0,01).

5.4 Ensaio de placa quente (*hot plate test*) (KURAIISHI *et al.*, 1983)

Neste modelo o extrato etanólico bem como todas as frações (todas na dose de 100 mg/kg i.p.) e a epicatequina XACC-1 (na dose de 100 µmol/kg i.p.) não apresentaram aumento significativo do tempo de latência. Este resultado permite inferir que nem o extrato etanólico, nenhuma das frações ou a epicatequina XACC-1 obtidos da casca do caule da espécie *X. americana* L. possuem atividade antinociceptiva central. Apenas o tratamento dos animais com morfina (na dose de 15 µmol/Kg, i.p.), analgésico opioide utilizado como padrão, causou um aumento no tempo de latência dos animais colocados sob o estímulo térmico da placa nos tempos 30 e 60 min (**Tabela 2**).

Tabela 2. Efeito do extrato etanólico, frações (100 mg/Kg, i.p.) e da epicatequina XACC-1 (100 µmol/Kg, i.p.) da casca do caule de *X. americana* L. no ensaio da placa quente.

Grupo	n ^a	Pré-tratamento ^b		Pós-tratamento ^b		
		0	30	60	90	120
Tempo (min)						
Controle	8	2,7 ± 0,5	2,5 ± 0,4	2,0 ± 0,4	4,2 ± 0,7	3,3 ± 0,8
Morfina	8	1,9 ± 0,5	9,0 ± 1,6**	7,4 ± 0,9**	5,4 ± 0,8	2,6 ± 0,2
Fração Acetato	8	5,9 ± 0,9	4,3 ± 0,4	4,9 ± 1,3	6,6 ± 1,8	5,6 ± 0,9
Fração Hexânica	8	2,9 ± 0,5	2,8 ± 0,6	2,9 ± 1,2	2,8 ± 0,6	1,9 ± 0,4
Fração Clorofórmica	8	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,4	2,2 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,4 ± 0,1
Fração Aquosa	8	1,8 ± 0,4	1,5 ± 0,2	2,4 ± 0,31	2,4 ± 0,6	1,5 ± 0,2
Extrato Etanólico	8	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,3
XACC-1	8	4,3 ± 0,9	3,2 ± 0,5	4,6 ± 0,7	5,2 ± 0,9	5,6 ± 1,3

^aNúmero de animais; ^b Valores são expressos como média±E.P.M, ^c não estatisticamente significativo: ** $p < 0,01$ (ANOVA *One Way* seguido pelo teste de Dunnett)

5.5 Ensaio de Peritonite Induzida por Zymosan A (DOHERTY *et al.*, 1985; LEITE *et al.*, 2007)

A migração celular foi reduzida de forma significativa após seis horas da administração intraperitoneal de 0,5 mL de Zymosan A (2 mg/mL), pela indometacina e XACC-1 (100 μ mol/Kg i.p.) extrato etanólico e frações (acetato e aquosa) (100 mg/Kg i.p.) quando comparados ao controle negativo (**Figura 11**). A indometacina, anti-inflamatório não-esteróide utilizado como padrão, induziu uma porcentagem de inibição da migração celular de 55,6 %. O extrato etanólico, as frações (aquosa e acetato) e a XACC-1 induziram inibição com significância quando $p < 0,01$. A XACC-1 e o extrato etanólico apresentaram uma porcentagem de inibição semelhante a do fármaco padrão de 46,0 % e 41,4 % respectivamente e as demais frações induziram uma inibição superior a 35,0 %. Os resultados obtidos permitem afirmar que o extrato, frações e substância isolada inibem o recrutamento leucocitário induzido por Zymosan A.

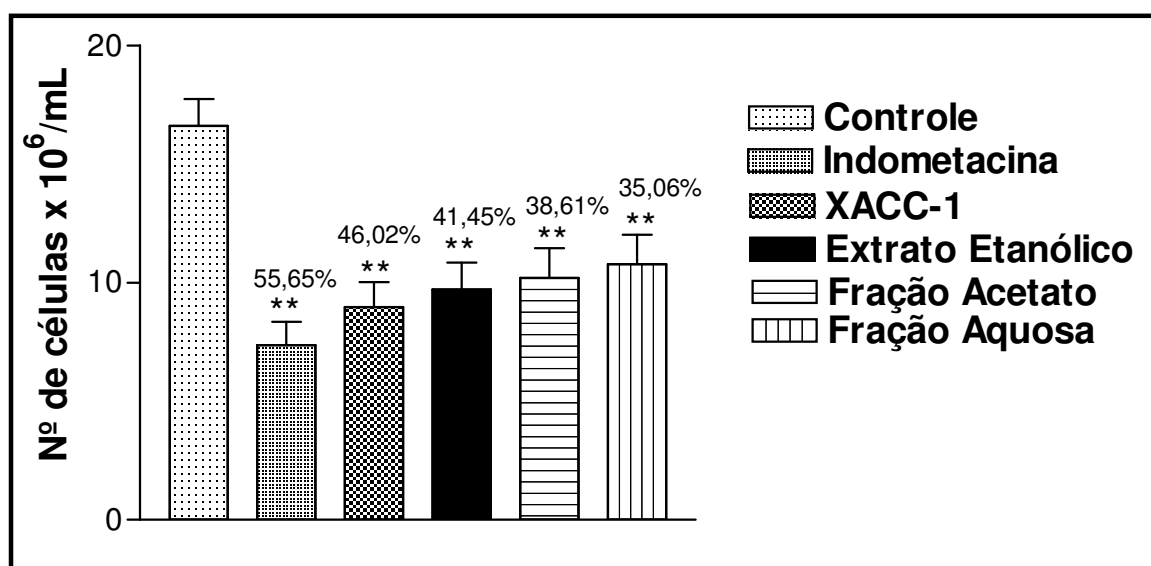


Figura 11. Efeito da XACC-1 (100 μ mol/Kg i.p.), extrato etanólico e frações (acetato e aquosa) (100 mg/Kg i.p.) no ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (n = 6). (** $p < 0,01$).

5.6 Ensaio de peritonite induzida por Carragenina (FERRANDIZ & ALCARAZ, 1991).

Com o objetivo de avaliar uma possível inibição do recrutamento celular pelo extrato etanólico, frações e pelo flavonoide XACC-1, foi realizado o ensaio de peritonite utilizando outro agente flogístico, a carragenina. Após quatro horas da administração da carragenina (1 % em salina; 250 μ l/animal) o recrutamento celular foi reduzido de forma significativa pelo fármaco padrão indometacina, pelo extrato etanólico, frações (acetato, aquosa, clorofórmica e hexânica) e pela XACC-1 quando comparados ao controle (Figura 12). A indometacina, anti-inflamatório não-esteróide utilizado como padrão, induziu a inibição do recrutamento celular em 72,0 % desta forma a contagem total de células do lavado peritoneal se assemelhou ao controle branco, realizado sem a presença do agente flogístico. O extrato etanólico, as frações e a XACC-1 induziram uma inibição estatisticamente significativa, sendo que a XACC-1 e a fração aquosa apresentaram uma inibição similar a do fármaco padrão indometacina com 66,1 % e 69,2 % respectivamente. As demais frações e o extrato etanólico também induziram uma inibição estatisticamente significativa quando $p < 0,01$. O resultado obtido permite-nos inferir que o extrato, frações e substância isolada da *X. americana* L. possuem atividade anti-inflamatória.

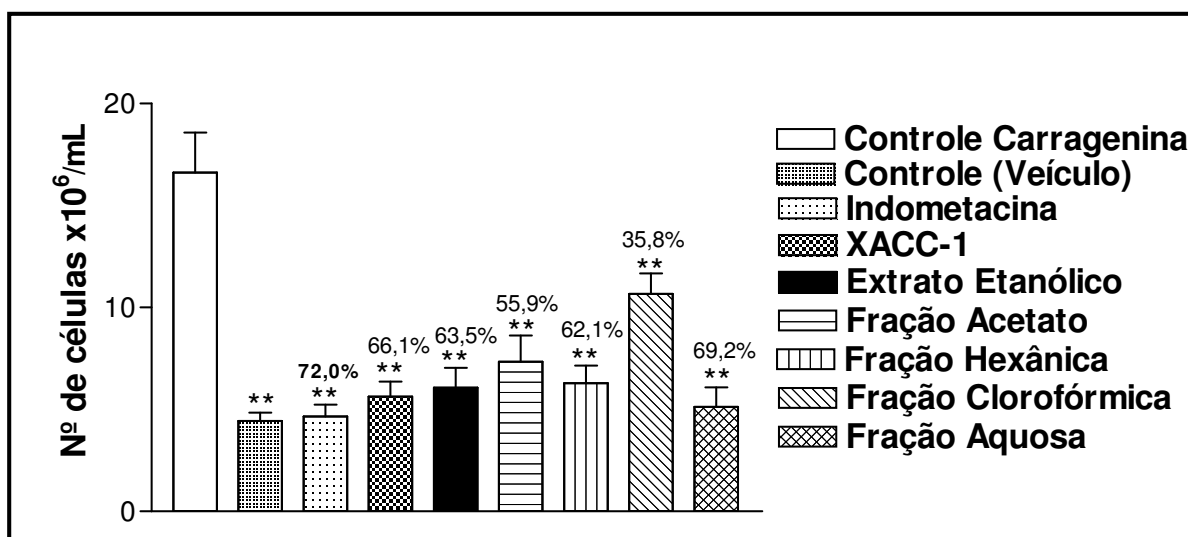


Figura 12. Efeito da XACC-1 (100 μ mol/Kg i.p.), do extrato etanólico e frações (100 mg/Kg i.p.) da casca do caule da *X. americana* L. em ensaio de peritonite induzida por Carragenina. Os resultados representam à média \pm E.P.M. (n=6). (** $p < 0,01$).

5.7 Atividade sequestrante de radicais (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998)

A atividade sequestrante de radicais, expressa em percentual de inibição (PI), exibida pelo extrato etanólico e frações da casca do caule da *X. americana* L., na concentração de 100 µg/mL está ilustrada na **Figura 13**. Com base nestes dados, evidencia-se que o extrato etanólico e frações da casca de *X. americana* L., contêm substâncias que atuam como doador de hidrogênio ao radical DPPH, entretanto esta ação é diferenciada entre eles. A fração hexânica apresentou baixo índice de inibição do radical DPPH, mostrando-se pobre em compostos antioxidantes. A fração acetato na concentração 100 µg/mL, reduziu o DPPH em 93,5 % sendo esta fração a mais ativa. O extrato etanólico na mesma concentração (100 µg/mL) foi eficaz em sequestrar o radical DPPH atingindo um percentual de inibição de 94,7 %. Conforme ilustra a **Figura 13** a comparação dos percentuais de inibição do extrato e frações, provenientes da casca do caule de *X. americana* L., com o flavonoide rutina evidenciou que o extrato etanólico e a fração aquosa da casca do caule de *X. americana* L. apresentaram atividade sequestrante de radicais comparáveis ao flavonoide padrão em sequestro de radicais.

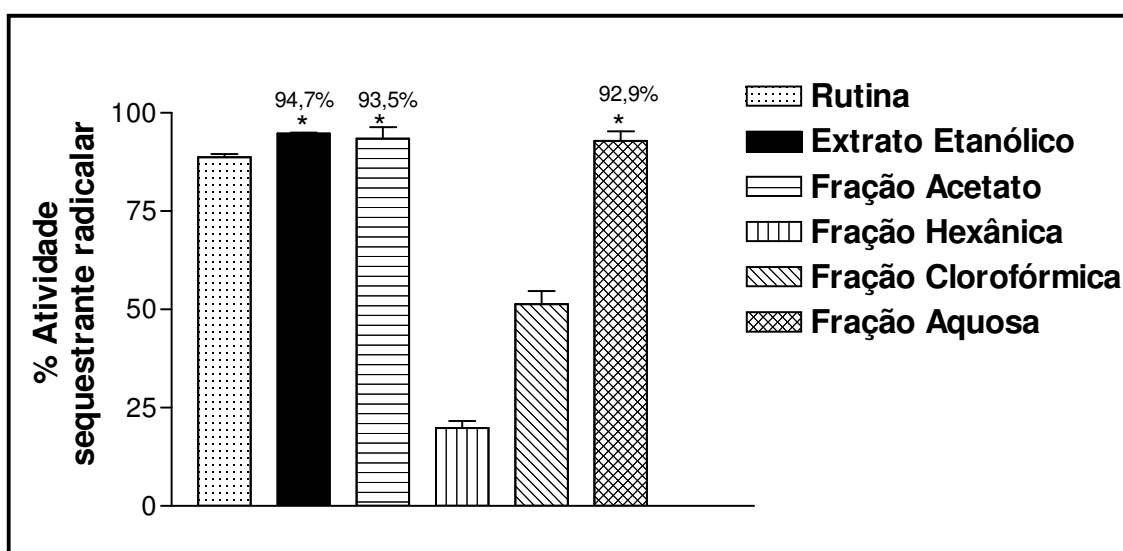


Figura 13. Atividade sequestrante de radicais, pelo método do DPPH, do extrato etanólico, frações (acetato de etila, hexânica, clorofórmica e aquosa) da casca do caule da *X. americana* L. todos na concentração de 100 µg/mL.

Na concentração de 50 µg/mL, o composto isolado, epicatequina (XACC-1) e controle positivo (rutina) apresentaram porcentagem de inibição do DPPH de 93,8 % e 64,4 % respectivamente conforme a **Figura 14**.

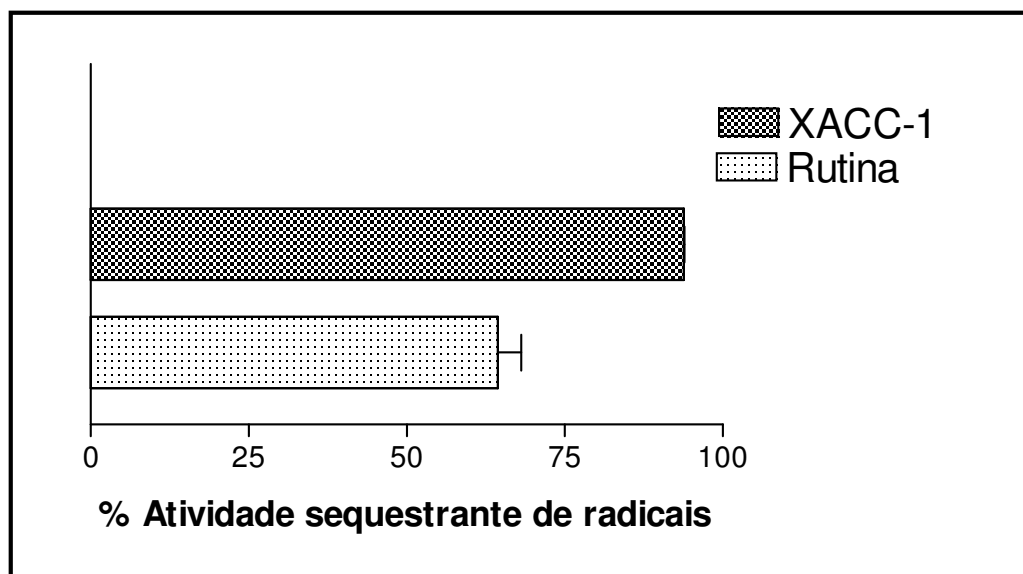


Figura 14. Atividade sequestrante de radicais pelo método do DPPH da XACC-1 isolada da casca do caule da *X. americana* L., e da rutina, na concentração de 50 µg/mL .

5.8 Determinação de fenóis totais (BONOLI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2007)

Visando correlacionar a atividade antioxidante com a presença de compostos fenólicos como a epicatequina XACC-1 foi realizada a determinação de fenóis totais. Os resultados da análise dos fenóis totais podem justificar a ação antioxidante do extrato e frações da casca do caule da espécie *X. americana* L. analisados. O extrato etanólico e as frações acetato, aquosa e clorofórmica, possuem o teor de fenóis de 678,6; 878,5; 736,8 e 243,5 mg de EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) respectivamente conforme a **Tabela 3**. Através destes resultados pode-se observar que as amostras avaliadas apresentaram elevado percentual de compostos fenólicos. O maior teor de fenóis totais para o extrato etanólico foi registrado na fração acetato. A fração hexânica apresentou o menor teor de fenóis totais.

Tabela 3. Conteúdo de fenóis totais (FT) e atividade sequestrante radicalar realizada utilizando-se o método do DPPH (CE₅₀) do extrato etanólico, frações e da XACC-1 da

Amostras	CE ₅₀ ± DP (µg/mL)	FT (mg de EAG/g de extrato EtOH ± DP)
Extrato Etanólico	32,7 ± 0,2	678,6 ± 2,3
Fração Hexânica	NA	90,2 ± 2,4
Fração Clorofórmica	84,2 ± 3,0	243,5 ± 3,0
Fração Acetato	29,6 ± 2,9	878,47 ± 0,7
Fração Aquosa	33,6 ± 5,1	736,8 ± 1,5
XACC-1	34,6 ± 3,0	NT

NA – Não ativo; NT – Não testado

6. DISCUSSÃO

O interesse em se investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da casca do caule da espécie *Ximenia americana* L., consiste, principalmente, no corrente uso terapêutico popular desta espécie, em diferentes regiões do mundo (BRASILEIRO, 2008). As cascas do caule são utilizadas em diversas doenças inflamatórias, e está relacionada a uma potente ação cicatrizante (VERAS & MORAIS, 2004). Na literatura encontramos poucos relatos, isolados, da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante de alguns extratos desta espécie, sendo este o primeiro trabalho a correlacionar estas atividades utilizando não só o extrato etanólico, mas também as frações provenientes deste extrato e a epicatequina (XACC-1) isolada da fração em acetato de etila da casca do caule de *X. americana* L. (BRASILEIRO, 2008; SORO *et al.*, 2008).

Tendo em vista o vasto uso na medicina popular desta espécie, a primeira etapa do presente trabalho consistiu na avaliação da toxicidade aguda aproximada do extrato etanólico e todas as frações testadas da *X. americana* L. que indicou que em dose cinco vezes superior a utilizada nos experimentos do presente trabalho (500 mg/Kg) houve sinais de toxicidade e morte de animais, com exceção para o extrato etanólico e a fração hexânica, que nesta dose, não induziram a morte de nenhum animal. Embora sinais de toxicidade reversível tenham sido observados com o extrato etanólico, a exemplo letargia e irritações oculares. Em outros trabalhos realizados com extratos da casca do caule de *X. americana* L. pela via intraperitoneal foram obtidos resultados semelhantes. No ensaio de toxicidade aguda realizado por SORO *et al.*, (2008) utilizando o extrato aquoso, foi calculada uma $DL_{50} = 219$ mg/Kg e com uma dose de 400 mg/Kg verificou-se a morte de todos os animais tratados com este extrato. BRASILEIRO (2008) avaliou a toxicidade aguda do extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* L. e registrou uma $DL_{50} = 750$ mg/Kg. O que evidencia que a *X. americana* L. deve ser utilizada com precaução para fins terapêuticos pela população. A toxicidade aguda da epicatequina XACC-1 não foi avaliada devido a pouca quantidade, porém os animais foram observados durante a realização de todos os ensaios realizados com esta substância e não apresentaram sinais de toxicidade macroscópicos até a dose de 300 μ mol/Kg.

Sabendo-se que, de acordo com COOLIER *et al.* (1968), o ácido acético atua indiretamente induzindo a liberação de mediadores endógenos que estimulam as fibras nociceptivas assim como as que são sensíveis aos AINES e aos analgésicos opioides, o grupo de pesquisa de DERAEDT *et al.* (1980) descreveu a quantificação de prostaglandinas por radioimunoensaio em exsudatos peritonias de ratos após a administração intraperitoneal de ácido acético encontrando altos níveis de PGE2 α e PGF2 α durante os primeiros 30 min. Não

obstante, foi achado que a administração intraperitoneal de ácido acético induz a liberação não apenas de prostaglandinas, mas também de mediadores do sistema nervoso simpático a exemplo de acetilcolina e noradrenalina (HOKANSON, 1978; DUARTE *et al.*, 1988; NETO *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos neste trabalho, no que se refere ao ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, evidenciaram que o extrato etanólico, todas as frações testadas e a XACC-1 provenientes da espécie *X. americana* L. possuem atividade antinociceptiva. O que corrobora com os achados de SORO *et al.* (2008) que testou o extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. e observou a indução de uma significativa inibição do número de contorções abdominais na dose de 100 mg/Kg que foi capaz de inibir em 61,1 % o número de contorções abdominais. No presente estudo pudemos demonstrar que a XACC-1, flavonoide isolado da fração acetato, proveniente do extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* L. foi capaz de inibir 98,5 % das contorções abdominais, utilizando-se a dose de 100 µmol/Kg. O que sugere que flavonoides como a epicatequina XACC-1, sejam importantes substâncias promotoras desta atividade antinociceptiva ocasionada por alguns extratos e frações obtidos desta planta. Além disso, os resultados obtidos a partir da determinação da curva dose-resposta mostram que a potência da XACC-1 ($DE_{50} = 32,0$ µmol/Kg) é comparável a do fármaco padrão dipirona ($DE_{50} = 29,3$ µmol/Kg), entretanto a XACC-1 possivelmente apresenta uma maior eficácia, pois foi capaz de atingir um efeito inibitório máximo, superior ao verificado para o fármaco padrão. Do ponto de vista da terapêutica a eficácia é um parâmetro farmacológico mais importante que a potência tendo-se em vista que a finalidade primordial de um fármaco é a sua maior capacidade de resolução de uma determinada patologia causando o menor dano possível à saúde do paciente.

Embora o ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético represente um modelo de nocicepção periférica, o qual consiste de estímulos de alta intensidade e a resposta nociceptiva de curta duração, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias são ativas neste modelo, inibindo, a saber: os hipotensores, depressores e estimulantes do SNC (HENDERSHOT & FORSAITH, 1959), anti-histamínicos (YEN, 1985) e antidepressivos triciclícos (TAKAHASHI & PAZ, 1987). Este fato demonstra que a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético deve ser efetuada de forma cautelosa em conjunto com outros testes.

O ensaio de formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de fármacos analgésicos. A injeção de formalina produz resposta bifásica

distinta: uma primeira fase mediada por substâncias neurogênicas e que representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C, ocasionando uma dor neurogênica; e uma segunda fase mediada por substâncias pró-inflamatórias, por exemplo, as prostaglandinas, ocasionando uma dor de origem inflamatória. Os analgésicos de ação central como os opioides inibem as duas fases, enquanto substâncias de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-esteroides e glicocorticoides, inibem somente a segunda fase (HUSNKAAR & HOLE, 1987). Este modelo é útil para detectar analgésicos do tipo não-esteroides, além de ser capaz de dissociar a dor do tipo inflamatória e não-inflamatória. Além disso, permite avaliar em animais a dor contínua de intensidade moderada causada pela lesão do tecido e o papel dos sistemas endógenos na regulação da dor (TJOLSEN *et al.*, 1992). Nossos dados mostram que a XACC-1 foi capaz de inibir as duas fases do experimento mostrando-se ativa tanto na dor neurogênica quanto na dor inflamatória, com uma porcentagem de inibição superior a do fármaco padrão indometacina. O extrato etanólico e a fração aquosa inibiram significativamente a segunda fase do experimento sugerindo que estes produtos podem induzir antinocicepção periférica como os AINEs.

Baseando-se nestes resultados podemos inferir que o efeito antinociceptivo da XACC-1 pode ser atribuído a inibição tanto das prostaglandinas como de outros mediadores envolvidos neste modelo. No trabalho de SORO *et al.* (2008) no que se refere ao ensaio de formalina utilizando-se o extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. verificou-se que uma dose de 50 mg/Kg induziu uma inibição do tempo de lambida da pata em 66,6 % na segunda fase, porém não induziu uma inibição significativa da primeira fase do experimento, mesmo quando na dose de 100 mg/Kg, a mesma utilizada neste trabalho, o que leva a crer que a epicatequina possui um importante papel na atividade antinociceptiva quando a casca do caule da *X. americana* L. foi utilizada.

SORO *et al.* (2008) avaliaram também a atividade antinociceptiva central do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. Para esta finalidade utilizaram o teste de retirada da cauda (D'AMOUR & SMITH, 1941; GRAY *et al.*, 1970) que assim como o ensaio de placa quente (KURAISHI *et al.*, 1983) avalia a antinocicepção central a partir da utilização do estímulo térmico. Os mecanismos utilizados nestes ensaios estão relacionados a uma atividade primária na medula espinhal como também a processamentos em regiões superiores do sistema nervoso central (principalmente o córtex) (YAKSH & RUDY, 1977). Apresenta diversas vantagens como alta sensibilidade a potentes analgésicos e baixo dano tecidual.

Assim como no trabalho de SORO *et al.* (2008) não foi evidenciada nenhuma atividade central significativa da casca do caule da *X. americana* L.

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, frações e epicatequina provenientes da casca do caule de *X. americana* L. no que se refere à migração celular, ensaios de peritonite utilizando agentes flogísticos distintos foram realizados.

O Zymosan A é um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Sacharomyces cerevisiae* capaz de induzir a degranulação de mastócitos, liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, ativar macrófagos e de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico, além de ativar a via alternativa do sistema complemento. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo induz um aumento no extravasamento vascular, um dos sinais preliminares da inflamação (RAO *et al.*, 1994; BOUGHTON-SMITH & GHELANI, 1995; JOHNSON *et al.*, 1975). Esta é uma etapa chave na formação do exsudato inflamatório e é seguida por um recrutamento tempo dependente de células, especialmente neutrófilos (DOHERTY *et al.*, 1985). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , ativam a via de sinalização em células endoteliais, a qual regula a expressão de moléculas de adesão para iniciar o recrutamento de leucócitos circulantes e células migratórias parcialmente ativadas. Foi demonstrado neste trabalho que o extrato etanólico, frações acetato e aquosa bem como a XACC-1 induzem efeitos inibitórios sobre o recrutamento celular (LEITE *et al.*, 2007).

Para melhor avaliar os mecanismos responsáveis por essa inibição do recrutamento celular foi realizado o ensaio de peritonite induzido por carragenina. A carragenina é um polissacarídeo sulfatado proveniente de um musgo marinho da Irlanda denominado *Chondrus crispus* (VAN ARMAN, 1979). Tendo-se em vista que a injeção de carragenina também ocasiona o recrutamento leucocitário (ALMEIDA *et al.*, 1980; COMPASSO *et al.*, 1975) e principalmente pelo perfil inflamatório que este agente flogístico apresenta ao induzir fortemente a liberação de mediadores como as prostaglandinas, WALLACE *et al.*, (1999) demonstraram que a resposta celular inflamatória induzida pela carragenina é mediada principalmente pela COX-1. Outros estudos referem também a participação de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que foram detectados altos níveis de TNF- α , IL-1 α e IL-1 β após a injeção de carragenina (UTSUNOMIYA *et al.*, 1991; CUZZOCREA, *et al.*, 1999). Anti-inflamatórios não-esteroides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase reduzindo a biossíntese de prostaglandina (FARSAM *et al.*, 2000). Os AINEs são capazes de inibir o acúmulo do exsudato e a mobilização de leucócitos entre três e seis horas após aplicação da

carragenina (VINEGAR *et al.*, 1973). Os resultados obtidos no ensaio de peritonite induzida por carragenina sugerem que, provavelmente, o extrato etanólico, todas as frações e substância isolada que foram testados possuem ação semelhante aos AINEs, porém mais testes são necessários para comprovar esta afirmação.

Os resultados de atividade ant-inflamatória encontrados podem ser explicados, ao menos em parte, pela presença de flavonoides presentes na casca do caule de *X. americana* L. que são descritos como capazes de bloquear síntese de leucotrienos, importantes na quimiotaxia e síntese de prostaglandinas, que são importantes na gênese de inflamação e dor (MORROW & ROBERTS, 2001). Diversas atividades biológicas já foram demonstradas para os flavonoides, entre elas atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (MIDDLETON *et al.*, 2000), bloqueio da fosfolipase A2, inibição direta de ciclooxigenases e/ou de lipooxigenases, importantes para o metabolismo do ácido araquidônico e geração de PGs e LTs (LINDAHL & TAGESSON, 1997; MIDDLETON *et al.*, 2000; KWAK *et al.*, 2003).

GALVEZ *et al.*, (1995) avaliaram a atividade antiperoxidativa de vários flavonoide sobre a peroxidação de membrana de células de fígado de rato induzidas pelo sistema enzimático do ácido araquidônico. Todos os flavonoide testados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica induzida por ácido araquidônico, os flavonoide que apresentaram melhores resultados, em ordem decrescente, foram: delphinidina, epicatequina, catequina, kaempferol, quercetina, luteonina, naringenina e apigenina.

A atuação de flavonoides como a epicatequina XACC-1 em processos inflamatórios pode ser explicada pela sua estrutura química (**Figura 8, p. 57**). A configuração das hidroxilas no anel B é determinante no processo de eliminação dos radicais livres (HARBORNE & WILLIAMS, 2000) um importante mecanismo pelo qual os flavonoides inibem a formação de metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas e leucotrienos. A XACC-1 possui duas hidroxilas no anel B, nas posições B-3 e B-4. Possuindo então uma considerável capacidade doadora de elétrons neste anel, e confere uma maior estabilidade ao radical formado. O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula é um fator que também contribui bastante para a atividade antioxidante deste composto (HEIM *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-FLÓREZ *et al.*, 2002).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias puras e extratos de plantas. Um dos métodos mais usados envolve a medida do sequestro de radicais livres tais como o radical ácido 2,2'-azino-bis (etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS⁺), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), ou outros radicais coloridos

(SOLER-RIVAS *et al.*, 2000). Dois parâmetros bastante utilizados para determinar a capacidade sequestradora de radicais livres por uma amostra são a concentração efetiva em 50 % (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50 %, e o percentual de inibição, porcentagem total do radical DPPH que reagiu com a amostra antioxidante no estado estacionário (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998).

A importância da determinação de fenóis totais presente no extrato e frações da *X. americana* L. reside no fato de ser atribuído aos compostos fenólicos como ácidos fenólicos, taninos, diterpenos e flavonoides os efeitos antioxidantes de diversas plantas (CHUNG *et al.*, 1998; PIETTA, 2000; TUNG *et al.*, 2007). A determinação de fenóis totais é um método indireto de avaliação da atividade antioxidante e fornece informações importantes que podem caracterizar os produtos naturais como fonte de substâncias sequestradoras de radicais livres (ROGINSKY & LISSI, 2005).

Dentre os diversos métodos desenvolvidos para a quantificação de compostos fenólicos, o método do reagente de Folin-Ciocalteu tem sido bastante utilizado (ATOUI *et al.*, 2005). O extrato etanólico e as frações aquosa e acetato provenientes das cascas do caule da *X. americana* L. apresentaram alta atividade sequestrante radicalar pelo método fotocolorimétrico do DPPH. A XACC-I apresentou atividade sequestrante radicalar similar a do flavonoide utilizado como padrão, rutina (**Figura 15**), tendo-se em vista a concentração molar na mesma ordem de grandeza (0,17 µM para a XACC-1 e 0,075 µM para a rutina).

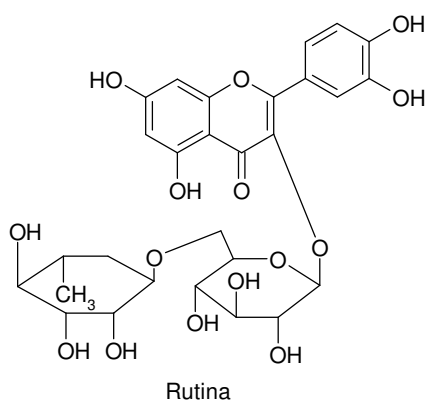


Figura 15. Estrutura química da rutina, flavonoide utilizado como padrão de sequestro radicalar (Adaptado de VELASCO *et al.*, 2008).

O extrato e frações apresentaram também alto teor de fenóis totais pelo ensaio espectrofométrico com o reagente Folin-Ciocalteu. A fração acetato, da qual foi isolada a

XACC-1, apresentou uma maior quantidade de fenóis totais, seguida pela fração aquosa. Estas frações foram as mais ativas com relação à atividade antioxidante, provavelmente por apresentarem em suas composições químicas flavonoides como a epicatequina XACC-1 em maior quantidade. A fração hexânica foi a que apresentou o menor teor de fenóis totais, o que já era esperado, por questões de polaridade, tendo em vista que os flavonoides tendem a se associar com moléculas de solventes orgânicos de polaridade mediana ou maior, como o acetato de etila, e não com o hexano que é um solvente apolar (HAVSTEEN, 2002).

Os resultados obtidos no que concerne à atividade antioxidante e a determinação de fenóis totais corroboram com os trabalhos de BRASILEIRO (2008) que avaliou o teor de fenóis totais e atividade de sequestro de radicais do extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* L.

Embora a epicatequina XACC-1 isolada da casca do caule de *X. americana* L. tenha apresentado atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, possuindo uma ação inibitória sobre o recrutamento celular, não podemos excluir a participação de compostos adicionais nos extratos e frações testados.

Tendo em vista que as plantas medicinais são capazes de exercer sua ação terapêutica pela ação de metabólitos secundários como o flavonoide epicatequina (QUINTANS-JÚNIOR, 2000), apesar dos diversos estudos realizados com extratos obtidos das folhas, caule, raiz e frutos da *X. americana* L. encontrados na literatura, poucos evidenciam a atividade de constituintes isolados desta espécie. Uma minuciosa pesquisa objetivando-se encontrar dados que confirmem a presença deste flavonoide na espécie *X. americana* L. comprovou apenas o isolamento do flavonoide epicatequina na raiz da variante *X. americana caffra* (Sond) Andler por MWANGI *et al.*, (1993), dado que reforça a importância do presente trabalho no intuito de explicitar a ação de constituintes de plantas utilizadas na medicina popular. Portanto, nossos resultados podem contribuir para um melhor conhecimento desta planta medicinal e da ação farmacológica antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico, frações bem como da epicatequina XACC-1 provenientes da casca do caule de *X. americana* L. Estudos adicionais ainda serão necessários para confirmar a utilidade desta espécie no tratamento da dor e inflamação.

7. CONCLUSÕES

Diante do exposto, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A fração acetato, clorofórmica e aquosa apresentaram toxicidade aguda quando administradas na dose de 500 mg/Kg (dose 5 vezes maior que a utilizada nos ensaios). O extrato etanólico juntamente com a fração hexânica não induziram a morte de nenhum animal.
- Atividade antinociceptiva do extrato etanólico, frações (aquosa, clorofórmica, hexânica e acetato) e da epicatequina XACC-1 foi demonstrada através dos ensaios de contorções abdominais induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina. Nestes ensaios verificou-se que a XACC-1 apresentou uma maior eficácia e potência equivalente ao fármaco padrão dipirona evidenciada pelo cálculo da DE₅₀ no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- Nenhuma das frações, extrato ou isolado testados apresentaram atividade antinociceptiva central, verificada através do ensaio de placa quente;
- Foi observada uma atividade anti-inflamatória nos modelos de recrutamento celular induzido por zymosan A e carragenina;
- O extrato etanólico, a fração aquosa e acetato, bem como a XACC-1, provenientes da *X. americana* L. apresentaram alta atividade sequestrante radicalar observada utilizando-se o método fotolorimétrico do DPPH; O extrato etanólico, frações aquosa e acetato apresentaram alto teor de fenóis totais observado utilizando-se o ensaio espectrofométrico com o reagente Folin-Ciocalteu. Essas frações (aquosa e acetato) e o extrato etanólico apresentaram maior capacidade sequestrante radicalar provavelmente por apresentar em sua composição química flavonoides como a epicatequina XACC-1 em grande quantidade.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sustenta a afirmativa de que o extrato etanólico, frações (aquosa, clorofórmica, hexânica e acetato) e a epicatequina XACC-1 são capazes de modular a resposta nociceptiva e inflamatória aguda. As frações, aquosa e acetato, o extrato etanólico e a XACC-1 são capazes de sequestrar radicais livres, sendo esta uma possível via de ação na nocicepção e inflamação.

8. REFERÊNCIAS

AKKOL, E. K.; YESILADA, E.; GUVENÇ, A. Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p. 251–257, 2008.

ALBERTINE, R.; AIMBIRE, F. S. C.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEXEIRA, A. S.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ZÃNGARO, R. A.; LOPES-MARTINS, R. A. B. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v.74, p. 101, 2004.

ALMEIDA, A. P.; BAYER, B. M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M. A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.214, p. 74-79, 1980.

ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*, **Bioresource Technology**, v.95, p. 229-233, 2004.

ATOUI, A. K., MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile, **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.89, p. 27-36, 2005.

AUF'MKOLK, M.; KOHRLE, J.; KAMINSKI, T.; JORGENSEN, E. C. Flavonoids and plant pigments inhibit iodothyronine deiodinases. **Acta Endocrinologica**, v. 96, p. 240-242, 1981.

ALVES, C. Q.; BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides, **Diálogos & Ciência**, v. 12, p. 1-6, 2007.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais e bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v.13, p. 29-39, 1991.

BARTFAI, T. Telling the brain about pain. **Nature**, v.410, p. 425-427, 2001.

BASSO, L. A.; DA SILVA, L. H.; FETT-NETO, A. G.; DE AZEVEDO, W. F. J. R.; MOREIRA, I. D. E. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; ASTOLFI FILHO, S.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B.; SANTOS, D. S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506. 2005.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BERETZ, A.; ANTON, R.; CAZENAVE, J. P. The effects of flavonoids on cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: CODY, V. M.; E. HARBORNE, J. B. (eds.). “Plant flavonoids inbiology and medicine : biochemical pharmacological and structure-activity relationships.” New York: **Alan R. Liss**, p. 281-296, 1986.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidative phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds, **Journal of Agricultura Food Chemistry**, v.52, p. 5195-5200, 2004.

BOTTING, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3 **Clinical Infectious Diseases**, v.5, p. 202-10, 2000.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste especialmente do Ceará. 3 ed. **Mossoró: Escola Superior de Agricultura**, p. 32-33, 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2010.

BRASILEIRO, M. T. Padronização, atividade biológica e desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-sólidas à base de *Ximenia americana* L. **Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Universidade Federal de Pernambuco, 2008.

BRATER, D. C. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal functions: focus on cyclooxygenase-2-selective inhibition. **American Journal of Medicine**, v. 13, p. 65S-71S, 1999.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Revista de Nutrição**, v. 56, p. 317-333, 1998.

BROCHE, F.; TELLADO, J. M. Defense mechanisms of the peritoneal cavity. **Current Opinion in Critical Care**. v. 7, p. 105-116, 2001.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, Chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-Kappa B). **Planta Médica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

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

CAPETOLA, R. J.; SHRIVER, D. A.; ROSENTHALE, M. E. Suprofen, a new peripheral analgesic. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 214, p. 16-23, 1980.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, p. 448-464, 2004.

CARVALHO, W. A.; LEMONICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 137-158; 221-240, 1998.

CARVALHO, W. A.; LEMONICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos, em: BRAZ, J. R. C., CASTIGLIA, Y. M .M.- Temas de Anestesiologia. Curso de Graduação em Medicina, 2 ed, São Paulo, **Artes Médicas**, p. 265-280, 2000.

CARVALHO-JÚNIOR, R. J. Técnicas farmacológicas de tratamento da dor. **Dor é coisa séria**. v. 532, p. 21-24, 2006.

CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido Nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, p. 417-423, 2002.

CESARE, P.; McNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. **Current Opinion Neurobiology**, v. 7, p. 493-499, 1997.

CHABNER, B. A. "Taxol". **Principles and practice of oncology: PPO Updates**. v. 5, p. 1-10, 1991.

CHANDRASEKHARAN, N. V. ; DAI, H ; ROOS, K. L. ; EVANSON , N. K. ; TOMSIK, J. ; ELTON, T. S. ; SIMMONS, D. L. COX – 3 a ciclooxigenase – 1 variante inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-1931, 2002.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica. **World Scientific**, v. 1, 1986 and v. 2, 1987.

CHAUDHRY, P. S.; CABRERA, J.; JULIANI, H. R.; VARMA, S. D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids sulindac and indomethacin. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1996-1998, 1983.

CHHABRA, S. C.; UISO, F. C. A survey of the medicinal plants of Eastern Tanzania for alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. **Fitoterapia**, v. 61, p. 307-316, 1990.

CHUNG, K. T.; WONG, T. Y.; HUANG, Y. W.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 38, p. 421-464, 1998.

CODY, V. J. R.; MIDDLETON. E.; HARBORNE, B. J. Progress in Clinical and Biological Research. **Biochemical, Pharmacological, and Structure-activity relationships**, v. 213, 1986.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: Conran, RS; Kumam, V; Collins, T. Robbins pathologic disease. Philadelphia: **WB Saunders Company**, 1999.

COMPASSO, F.; DUNN, C. J.; YAMAMOTO, S.; WILLOUGBBY, D. A.; GIROUD, J. P. Further studies on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Journal of Pathology**, v. 116, p. 117-24, 1975.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources – review. **The Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 7, p. 66-76, 1996.

COOLIER, 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.

CORRÊA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**. v. 18, p. 460-467, 1995.

CUZZOCREA, S.; SAUTEBIN, L.; DE SARRO, G.; CONSTANTINO, G.; ROMBOLA, L.; MAZZON, E.; IALENTI, A.; DE SARRO, A.; CILIBERTO, G.; DI ROSA, M.; CAPUTI, A.

P.; THIEMERMANN, C. Role of IL-6 in the pleurisy and lung injury caused by carrageenan. **Journal Immunology**, v. 163, p. 5094-5104, 1999.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L.; A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DAS, S.; SASMAL, D.; BASU, S. P. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of arbortristoside-A. **Journal of Ethnopharmacology**. 116 p. 198-203, 2008.

DE PAOLA, D. **Mecanismos básicos das doenças**. Atheneu; São Paulo: p. 47-71, 1988.

DERAEDT, R., JOUQUEY, S., DELEVALLEE, F., FLAHAUT, M., Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24. 1980.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain, **Brazilian Journal Anaesthesiology** v. 75, p. 193-200, 1995.

DOHERTY, N. X.; POUBELLE, P.; BORGEAT, P.; BEAVER, T. H.; WESTRICH, G. L.; SCHRADER, N. L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-789, 1985.

DRAWAN, B. N.; CESSSELIN, F.; RAGHUBIR, R. *et al.* Classification of opioid receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 48, p. 567-592, 1996.

DRAY, A.; PERKINS, M. Bradykinin and inflammatory pain. **Trends in Neurosciences**, v. 16, p. 99-104, 1993.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brazilian Journal Anaesthesiology**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DUARTE, J. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice, **Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341–343, 1988.

DUBOIS, R. N.; ABRAMSON, S. B.; CROFFORD, L.; GRUPTA, R. A.; SIMON, L. S.; VAN DE PUTTE, L. B.; LIPSKY, P. E. Cyclooxygenase in biology and disease. **The FASEB Journal**, v. 12, p. 1063-1073, 1998.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 343-350, 2003.

ERICKSON, N.; FURST, D. E. Mechanisms of action of nonsteroidal anti-inflammatory. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 8, p. 9-18, 1998.

EROMOSELE, C. O.; EROMOSELE, I. C. Fatty acid compositions of seed oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia americana*. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 303, 2002.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B.; ROZENTAL, S. *et al.* Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v. 153, p. 647–52, 2002.

FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A. R.; JAHANIANI, F. Antiinflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 443-447, 2000.

FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A.; TAKEDA, Y. C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with potential pesticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1872-4, 2000.

FERNANDEZ, A.; BEZERRA, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus comunicações, 1990.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Inflammation Research**, v. 32, p. 283–288, 1991.

FIELDS, H. L; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall PD, Melzack R (eds) textbook of pain. **Churchill Livingstone**, Edinburgh, 1994.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 433-442, 2001.

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R.; REPETTI, L.; NETTO, T. R.; BORLINA, A. A. Terapias sistêmicas e oncologia veterinária. **Nosso Clínico – Medicina Veterinária para Animais de Companhia**. v. 30, p. 28-38, 2002.

FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Cardiotônicos: Histórico e Perspectivas de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. **Química Nova**, v. 19, p. 182-189, 1996.

FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International Journal of Microcirculation Clinical**, v.15, p.17-21, 1995.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 187-93, 1998.

FUKUDA, R.; KELLY, B.; SEMENZA, L. G. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. **Cancer Research**. v. 63, p. 2330–2334, 2003.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J. X.; O'BRIEN, P. J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p. 91- 104, 2002.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates, 2 ed. New York, **Raven Press**, 1992.

GALLUCCI, R. M.; SIMEONOVA, P. P.; MATHESON, J. M.; KOMMINENI, C.; GURIEL, J. L.; SUGAWARA, T.; LUSTER, M. I. Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice. **The FASEB Journal**, v.14, p. 2525-2531, 2000.

GALVEZ, J.; DE LA CRUZ, J. P.; ZARZUELO A.; DE LA CUESTA, F. S. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione-related enzymes. **Pharmacology**, v. 51, p. 127-133, 1995.

GEYID, A.; ABEBE, D.; DEBELLA, A.; MAKONNEN, Z.; ABERRA, F.; TEKA, F.; KEBEDE, T.; URGU, K.; YERSAW, K.; BIZA, T.; MARIAM, B. H.; GUTA, M. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles, **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 421–427, 2005.

GILLEN, C.; JANDER, S.; STROLL, G. Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. **J Neuroscience**, v. 51, p. 489-496, 1998.

GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor, em Madallena, & Cavalcanti. **Dor**. Saerj, Rio de Janeiro, v. 1, p. 13–34, 2003.

GRACE, P. A. Ischaemia-reperfusion injury. **British Journal of Surgery**, v. 81, p. 637–647, 1994.

GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 52-60, 1997.

GRAY, W. D.; OSTERBERG, A. C.; SCUTE, J. T. Measurement of the analgesic efficacy and potency of pentazocine by the D'Amour and Smith method. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 172, p. 154–162, 1970.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation.**, v. 116, p. 4-15, 2006.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. Opioid analgesics, em Goodman & Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**, 11 ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry.** v. 55, p. 481-504, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 26, p. 67-202, 2002.

HAWKEU, C. J. COX-2 Inhibitors. **Nature**, v. 353, p. 307-314, 1999.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry.** v.13, p. 572-584, 2002.

HENDERSHOT, L. C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone induced writhing in the mouse by weak analgesics and non analgesics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.125, p.237-240, 1959.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 10 years later. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, p. 367-375, 2002.

HOKANSON, G. C. Acetic acid for analgesic screening. **Journal of Natural Products**, v. 41, p. 497-498, 1978.

HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.

HONG, Y.; ABBOTT, F. V. Behavioural effects of intraplantar injection of inflammatory mediators in the rat. **Neuroscience**, v.63, p. 827-836, 1994.

HOPE, W.C.; WELTON, A. F.; FIELDER-NAGY, C.; BATULA-BERNARDO, C.; COFFEY, J. W. In vitro inhibition of the biosynthesis of slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) and lipoxygenase activity of quercetin. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p. 367-371, 1983.

HOUGHTON, P. J. Traditional plant medicines as a source of new drugs. In: **Trease and Evans' Pharmacognosy**. London, 15 ed., Ed. W. B. Saunders, cap. 17, p. 115-134, 2002.

HUANG, M. T.; LYSZ, T.; ABIDL, T. F.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. Inhibitory effect of curcumin on *in vitro* lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. **Cancer Research**. v. 51, p. 813-819, 1991.

HULL, M.; LIEB, K.; FIEBICH, B. L. Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, p. 671-683, 2000.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p. 69-76, 1985.

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

HUTCHINSON, J.; DALZIEL, J. M. Flora of West Tropical Africa. T. Nelson and Sons. London, 1954.

JAHROMI, M. A. F.; RAY, A. B. Antiherlipidemic effect of flavonoids from *Pterocarpus marsupium*. **Journal of Natural Products**, v.56, p. 989-994, 1993.

JAMES, D. B.; ABU, E. A.; WUROCHEKKE, A. U.; ORJI, G. N. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of the Medical Sciences**, v. 2, p. 284-8, 2007.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. Companhia Editora Nacional, São Paulo: 13 ed, 2002.

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

JULIUS, D.; Mc CLESKEY, E. W. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons. In: McMAHON S. B., KOLTZENBURG M., (eds) Wall & melzack's textbook of pain, 5 ed. **Elsevier**. p. 35-48, 2006.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. J. R. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KATO, N.; TOSA, N. Effects of dietary quercetin on serum lipids. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 47, p. 2119-2120, 1983.

KELLEY, W. N.; HARRIS, E. D. J.; RUDDY, S.; SLEDGE, C. B. **Textbook of Rheumatology**, 4 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1993.

KOEHN, F. E.; CARTER. G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, p. 206-220, 2005.

KONÉ, W. M.; ATINDEHOU, K. K.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K.; TRAORÉ, D.; DOSSO, M. Tradicional medicine in North Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p. 43-49, 2004.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings of the American Society of Experimental Biological**, v. 18, p. 418-20, 1959.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199-206, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: patologia: bases patológicas das doenças. 7 ed. São Paulo: **Elsevier**, 2005.

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

KWAK, W.J., MOON, T.C., LIN, C.X., RHYN, H.G., JUNG, H.J., LEE, E., KWON, D.Y., SON, K.H., KIM, H.P., KANG, S.S., MURAKAMI, M., KUDO, I., CHANG, H.W. Papyriflavonol A from *Broussonetia papyrifera* inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction and has a secretory phospholipase A(2)-inhibitory activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 299–302, 2003.

LEE, T. P.; MATTELIANO, M. L.; MIDDLETON, J. E. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. **Life Sciences**, v.31, p. 2765-2774, 1982.

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

LINDAHL, M., TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structures for selective inhibition of group II phospholipase A2. **Inflammation Research**, v. 21, p. 347–356, 1997.

LIU, K. C. S. C.; YANG, S. L.; ROBERTS, M. F.; ELFORD, B. C.; PHILLIPSON, J. D. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plant and cell cultures. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 637-640, 1992.

LODYATO, V. I.; YURKOVA, I. L.; SOROKIN, V. L.; SHADYRO, O. I.; DOLGOPALET, KISEL, A. M. Novel (3,5-di-tert-butyl-2-hydroxy-phenylcarbonyl)-alkanoic acids as potent antioxidants, **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 4253-4256, 2004.

LOZOYA, X.; Investigación y Ciencia. **Química Nova**, v. 4, p. 9, 1997.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora**, v. 26, p. 37, 2008.

MAGGI, C. A.; PATTACHINI, R.; ROVERO, P.; GIACHETTI, A. Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. **Journal of Autonomic Pharmacology**, v. 13, p. 23-93, 1993.

MAGGIO, G. D. Azione della Quercetina sull andamento di alcuni processi patologici sperimentali correlati alla malattia arteriosclerotica. **Rivista Italiano de Science Farmacologiche**, p. 28-37, 1956.

MAGGIO, J. E. Tachykinins. **Annual Review of Neuroscience**, v. 11, p. 13-28, 1988.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v.31, p. 1218-1223, 2008.

MALECOT, V.; NICKRENT, D. L.; BASS, P.; OEVER, L. V. D. A morphological cladistic analysis of Olacaceae. **Systematic Botany**, v. 29, p. 569 e 586, 2004.

MARCHAND, L. L. Cancer preventive effects of flavonoides – a review. **Biomedical Pharmacotherapy**. v. 56, p. 296-301, 2002.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, p. 271-278, 2002.

MARRONI, N. P.; MARRONI, C. A. Estresse Oxidativo e Antioxidante. **Ulbra**, p. 33-48, 2002.

MATHABE, M. C.; NIKOLOVA, R. V.; LALL, N.; NYAZEMA, N. Z. Antibacterial activities of medicinal plants used for the treatment of diarrhoea in Limpopo province. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 286-293, 2006.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. **Imprensa Universitária**, Fortaleza: p. 122-124, 2007.

McCORMACK, J. J. Pharmacology of antitumor bisindole alkaloids from *Catharanthus*. In: BROSSI, A. (ed.). **The alkaloids**, v. 37, p. 205-228, 1990.

McMAHON, S.B.; LEWIN, G. R.; WALL, P. D. Central hyperexcitability triggered by noxious inputs. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 3, p. 602-610, 1993.

MEVY, J. P.; BESSIERE, J. M.; GREFF, S.; ZOMBRE, G.; VIANO, J. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia americana* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 549- 553, 2006.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAMI, C. Y.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MONTENEGRO, M. R.; FECCHIO, D. Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. *in*: montenegro, M. R. & FRANCO, M. Patologia: processos gerais. 4. ed. São Paulo: **Atheneu**, cap. 6, p.109-128, 1999.

MOORE, K. W.; DE WALL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L. O garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORAN, E. M. Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 21, p. 193–201, 2002.

MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacóides e fator de ativação das plaquetas. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 503-516, 2006.

MOULIN, A.; TEISSERE, M.; BERNARD, C.; PIERONI, G. Lipases of the *Euphorbia characia* latex and structure function relationships with the B chain of ricin. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 91, p. 24, 1994.

MUNRO, J. M. Endothelial-leukocyte adhesive interactions in inflammatory diseases. **European Heart Journal**, v.14, p. 72-77, 1993.

MUTOH, M.; MATSUI, H.; TAKAHASHI, M.; TAKAMURA-ENYA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Japanese Journal of Cancer Research**. v. 91, p. 686–91, 2000.

MWANGI, J. W.; MALII, P.; GATHU, L.; TANAKA, T.; NONAKA, G. Polyphenols of *Ximenia americana* var. *caffra*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 185, 1994.

NAGEM, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G.; PEREIRA, C. A. S. Efeito de flavonoides sobre lipídeos em ratos e sobre enzimas metabolizadoras de drogas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37, p. 471-482, 1994.

NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T.; SILVA, M. C.; MIRANDA, L. C. G. Efeitos de derivados flavonoídicos sobre lipídeos em ratos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, p. 859-868, 1995.

NETO, A.G.; COSTA, J. M. L. C.; BELATI, C. C.; VINHOLIS, A. H. C.; POSSEBOM, L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L. A. E. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87–91, 2005.

NIJVELDT, J. R. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American journal of clinical nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. Trop. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, G. L. Mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina em camundongos. **Dissertação Mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

OLIVEIRA, L. F. Farmacologia da dor, em, Madallena & Cavalcanti. **Dor: SAERJ**, v. 2, p. 37– 44, 2003.

OMER, M. E. F. A.; ELNIMA, B. E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 122–126, 2003.

PAI, R.; SOREGHAN, B.; SZABO, I. L. *et al.* Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. **Nature Medicine**, v. 8, p. 289–293, 2002.

PALMER, R H. Cyclooxygenase 2 selective agents and upper gastrointestinal disease. **JAMA**. v.19, p. 283; v. 15, p. 1961-1962, 2000.

PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 26, p. 1-16, 1995.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PIPER, P. J. Formation and actions of leukotrienes. **Physiological Reviews**, v. 64, p. 744-757, 1984.

POTT, A.; POTT, V. J. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Plantas do Pantanal; **Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá – Mato Grosso**. 1994.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; AGRA, M. F.; SOUSA, M. F. V.; BARBOSA-FILHO, J. M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 21, p. 179-184, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. “Alterações comportamentais em roedores induzidas pela fração de alcaloides totais das vagens da *Prosopis juliflora* (SW) D.C. e abordagem fitoquímica.” **Tese de Mestrado em Produtos Naturais (LTF - UFPB)**, Paraíba, Brasil, 2000.

RAINVILLE, P.; DUNCAN, G. H.; PRICE, D. D.; CARRIER, B.; BUSHNELL, M. C. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. **Science**. 277: p. 968 – 971, 1997.

RAJA, S.N.; MEYER, R. A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N. **Textbook of pain**, 4th ed. **Churchill Livingstone**, v. 1, p. 11-57, 1999.

RANG, H. P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **Brazilian Medical Bulletin**, v.47, p. 534-548, 1991.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6 ed, São Paulo: Elsevier, 2007.

RASO, G. M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARLO, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sciences**, v. 68, p. 921–31, 2001.

RATES S, M. K. Plants as sources of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATTY, A. K.; DAS, N. P. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation: Structure activity relationship. **Biochemical Medicine Metabolic Biology**, v. 39, p. 69-79, 1988.

RIBEIRO, S.; SCHMIDT, A. P.; SCHMIDT, S. R. G. O Uso de Opioides no Tratamento da Dor Crônica Não Oncológica: O Papel da Metadona. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 644 – 651, 2002.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUNAR, K. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROCHA, S. M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**. v. 43, p. 86-90, 1978.

RODRIGUEZ, L. A.; HUERTA-ALVAREZ. C. Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users. **Cancer Letters**. v. 215, p. 1–20, 2004.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, **Food Chemistry**, v. 92, p. 235-234, 2005.

RUBY, J. A.; KUTTAN, G.; DINESH-BABU, K. V.; RAJASEKHARAN, K. N.; KUTTAN, R. Anti-inflammatory activity of natural and synthetic curcuminoids. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, v. 4, p. 103-106, 1998.

SACANDE, M.; VAUTIER, H. *Ximenia americana* L. **Forest & Landse Denm**. v. 112, p. 1-2, 2006.

SAKATA, K.; HIROSE, Y.; QIAO, Z.; TANAKA, T.; MORI. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. **Cancer Letters**, v. 199, p. 139-145, 2003.

SAMAD, T. A.; MOORE, K. A.; SAPIRSTEIN, A. *et al.* Interleukin-1 β -mediated induction of COX-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, p. 471-475, 2001.

SAMUELSSON, B.; DAHLEN, S. E.; LINDGREN, J. A.; ROUZER, C. A.; SERHAN, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, v. 237, p. 1171-1176, 1987.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, **Journal Science Food Agricultural**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTOS, J. L.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; OLIVEIRA, H. P.; BUELONI, R. H.; BOFFO, E.; MACHADO, R. G. P.; LONGO, M. C.; CHUNG, M. C. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a anti-inflamatório COX-2 seletivo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 235-240, 2007.

SATO, M.; SAWAMURA, D.; INA, S.; YAGUCHI, T.; HANADA, K.; HASHIMOTO, I. In vivo introduction of interleukin 6 gene into human keratinocyte: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but, not by the alternatively spliced form. **Archives of Dermatological Research**. p. 291-404, 1999.

SBED – Sociedade Brasileira Para o Estudo da Dor. 2005. Disponível em:
< www.dor.org.br/dor_impactos.asp>. Acesso em 20 de maio de 2005.

SCHAIBLE, H. G.; SCHMIDT, R. F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. **Journal of Physiology**, v. 403, p. 91-104, 1998.

SCHUG, S. A.; GARRET, W. R.; GILLESPIE, G. Opioid and non-opioid analgesics. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 1, p. 99-110, 2003.

SHARMA, J. N.; BUCHANAN, W. W. Pathogenic responses of bradykinin system in chronic inflammatory rheumatoid disease. *Exp. Toxicol. Pathol.* v. 46, p. 421- 433. SIGAL, E. The

molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. **American Journal Physiology**, 260: L13-L28, 1994.

SILVA G. G.; SOUZA, P. A.; MORAIS, P. L. D.; SANTOS, E. C.; MOURA, R. D.; MENEZES, J. B. Caracterização do fruto de ameixa silvestre (*Ximenia americana* L.) **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, p. 311-314, 2008.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, v. 35, p. 127-133, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. **2 ed. revista Porto Alegre/ Florianópolis: Ed Universidade /UFRGS/ Ed. Universidade/ UFSC**, 2000.

SNIJDELAAR, D. G.; DIRKSEN, R.; SLAPPENDEL, R. *et al.* Substance P. **European Journal of Pain**, v. 4, p. 121-135, 2000.

SOFOWORA, A.; Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. **John Wiley and Sons Limited**, 1982.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 1-9, 2000.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: Peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184-187, 2004.

SORO, T. Y.; TRAORE, F.; SAKANDE, J. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). **Comptes Rendus Biologies**, p. 1-7, 2008.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p. 640, 2005.

SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

STEIN, C.; YASSOURIDIS, A. Peripheral morphine analgesia. **Pain**, v. 71, p. 119-121, 1997.

SUNG, C. S.; WEN, Z. H.; CHANG, W. K. *et al.* Intrathecal Interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Research**, v. 1015, p. 145-153, 2004.

TAKAHASHI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 607-610, 1987.

THUN, J. M.; HENLEY, J. S.; PATRONO, C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94 p. 252-266, 2002.

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

TLASKALOVA-HOGENOVA, H.; TUCKOVA, L.; STEPANKOVA, R.; HUDCOVIC, T.; PALOVA-JELINKOVA, L.; KOZAKOVA, H.; ROSSMANN, P.; SANCHEZ, D.; CINOVA, J.; HRNCU, T.; KVERKA, M.; FROLOVA, L.; UHLIZ, H.; POWRIE, F.; BLAND, P. Involvement of innate immunity in the development diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1051, p. 787-798, 2005.

TRIPATHI, R.; MOHAN, H.; KAMAT, J.P. Modulation of oxidative damage by natural products. **Food Chem.**, 2005.

TUNG, Y. T.; WU, J. H.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**. V. 98, p. 1120-1123, 2007.

UCHOA, V. T.; JÚNIOR, R. A.; CARVALHO, C. M.; ABREU, F. C.; GOULART, H. F.; SANTANA, A. E. G. Ação Moluscicida da Madeira do Caule da *Ximenia americana* L. **In 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2006.

UGAZ, O. L. Investigación Fitoquímica. **Fondo Editorial: Pontificia Universidad Católica del Peru**, 1994.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. **Journal Immunology**, v. 147, p. 1803-1809, 1991.

VAN ARMAN, C. G. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. **Anti-inflammatory drugs**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, cap. 21, 82 p., 1979.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97-120, 1998.

VELASCO, M. V. R.; BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Associação da Rutina com *p*-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In Vitro* da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 23-27, 2008.

VERAS, A. O. M.; MORAIS, S. M. Análise dos Constituintes químicos de *Ximenia americana* Linn. **In: IX Semana Universitária e XIII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Ceará**. 2004.

VILELA-MORALES, E. A.; VALOIS, A. C. C. Recursos genéticos vegetais autóctones e seus usos no desenvolvimento sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 17, p.11-42, 2000.

VINEGAR, R.; TRAU, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristic of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 143, p. 711-4, 1973.

VOSS, C.; EYOL, E.; BERGER, M. R. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 211, p. 177-187, 2006.

WAHL, S. M.; FEDMAN, G. M.; MCCRTHY, J. B. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 789-796, 1996.

WALKER, K.; WATIKINS, L.R.; HANSEN, M. K.; NGUYEN, K. T. *et al.* Dynamic regulation of the pro-inflammatory cytokines, interleukin-1beta: molecular biology for non molecular biologists. **Life Sciences**, v. 65, p. 449-481, 1999.

WALLACE, J. L.; CHAPMAN, K.; MCKNIGHT, W. Limited anti-inflammatory efficacy of Cyclo-oxygenase-2-inhibition in carrageenan-airpouch inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 1200-1204, 1999.

WALLE, T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. **Free radical biology & medicine**, v. 36, p. 829-837, 2004.

WANG, H.; KOHNO, T.; AMAYA, F. *et al.* Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, p. 7986-7992, 2005.

WEBER, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **Journal of Molecular Medicine**, v. 81, p. 4-19, 2003.

WIKIPEDIA. *Ximenia americana* L., disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/ximenia>> acesso em: 20 de janeiro de 2010.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381–406, 2001.

YEN, G. C.; DUH, P. D. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 629–632, 1994.

YEN, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleminamine in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 235, p. 683-689, 1985.

ZHANG, D.; HAMAUZZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, **Food Chemistry**, v. 88, p. 503-509, 2004.