



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

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Piptadenia
stipulacea* (Benth.) Ducke (FABACEAE) E INIBIÇÃO DE COX POR GALETINA 3,6-
DIMETIL ÉTER (FGAL)**

**Maceió – AL
2011**

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (FABACEAE) E INIBIÇÃO DE COX POR GALETINA 3,6-DIMETIL ÉTER (FGAL)

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, como requisito a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde com área de concentração em Terapêutica Experimental pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

**Orientadora: Profa. Dra. Magna Suzana
Alexandre Moreira**

**Coorientadora: Profa. Dra. Bárbara
Viviana de Oliveira Santos**

**Maceió – AL
2011**

Catálogo na fonte
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

Q3a Queiroz, Aline Cavalcanti de.
Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae) e inibição de COX por Galetina 3,6-Dimetil éter (FGAL) / Aline Cavalcanti de Queiroz. – 2011.
95 f.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Co-orientadora: Bárbara Viviana de Oliveira Santos.

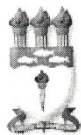
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011

Bibliografia: f. 80-95.

Inclui apêndices.

1. *Piptadenia stipulacea*. 2. Galetina 3,6-dimetil éter. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade anti-inflamatória. 5. Inibição de COX. 6. Sequestro radicalar. I. Título.

CDU: 615.322



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 Aline Cavalcante de Queiroz intitulado: "Atividades antinociceptiva e antiinflamatória de *Piptadenia Stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae)", orientada pela Profª. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 3 de março de 2011. Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata APROVADA.

Orientadora:

Magna Suzana Alexandre Moreira.

Profª. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira
Banca Examinadora:

Bagnólia Araújo da Silva.

Profª. Dra. Bagnólia Araújo da Silva - UFPB

Maria Aline Barros Fidélis de Moura.
Profª. Dra. Maria Aline Barros Fidélis de Moura - ESENFAR - UFAL

Fabiana de Andrade Cavalcante.
Profª. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante - ICBS - UFAL

À minha querida mãe, Cilene, e às minhas irmãs, Livia e Elane, pela ajuda e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me iluminado até o término deste trabalho;

A minha orientadora, Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira, que ao longo deste período de convivência, demonstrou o valor da orientação segura e firme não somente pela sua alta competência profissional, mas pela generosidade, compreensão e disponibilidade com que me acolheu;

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos, e à doutoranda Daysianne Pereira de Lira, por disponibilizarem os compostos para serem testados;

Aos membros da minha banca de qualificação, Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior e Profa. Dra. Êurica Adélia Nogueira Ribeiro, pela contribuição ao meu trabalho;

Aos membros da minha banca de defesa, Profa. Dra. Bagnólia Araújo da Silva, Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura, Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante, pela valiosa contribuição ao meu trabalho;

A minha mãe, Cilene Cavalcanti, por todo sacrifício que fez para que eu tivesse a oportunidade de estudar, pelo apoio e confiança;

As minhas irmãs, Livia Cavalcanti de Queiroz e Elane Cavalcanti dos Santos, e aos meus queridos familiares, que sempre me apoiaram de forma a conseguir tempo e disposição para desenvolver esse trabalho;

Aos membros do Laboratório de Farmacologia e Imunidade, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos e pelo acolhimento: Thays de Lima Matos Freire Dias, Éverton Tenório Souza, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva, Carolina Barbosa Brito da Matta, Gabriela Muniz de Albuquerque Melo, Anne Priscila da Rocha Porfírio, Mariana da Silva Santos, Yolanda Karla Cupertino da Silva e Morgana Vital de Araújo.

A todos os meus queridos amigos, que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento desse trabalho, em especial: Anne Mércia, Gabriela, Adriano, Thays, Everton e Ana Soraya;

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela valiosa contribuição na minha formação acadêmica;

A todos os colegas de minha turma de mestrado, pela união, companheirismo, desafios e alegrias compartilhadas;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pela concessão da bolsa de mestrado, a qual me propiciou condições de ter dedicação exclusivamente ao desenvolvimento do trabalho;

A todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

“Não se pode ensinar tudo a alguém, pode-se apenas ajudá-lo a encontrar por si mesmo”.

(Galileu Galilei)

QUEIROZ, A.C. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae) e inibição de cox por galletina 3,6-dimetil éter (FGAL).** 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, 2011.

RESUMO

Piptadeniastipulacea, pertence à família Fabaceae, é amplamente distribuída na caatinga. Esta espécie é conhecida no Nordeste brasileiro como jurema-branca, carcará e rasga-beiço, sendo utilizada na medicina popular para tratar inflamação. Neste trabalho, buscou-se investigar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fase aquosa, fase acetato de etila e de um flavonoide isolado das partes aéreas de *Piptadeniastipulacea*. As partes aéreas de *Piptadeniastipulacea* foram usadas para o fracionamento e, posteriormente o flavonoide galletina 3,6-dimetil éter (FGAL) foi obtido da fase clorofórmica da planta. Experimentos foram realizados em camundongos Swiss usando o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, ensaio da placa quente, teste de formalina e peritonite induzida por zymosan A. Para caracterizar o mecanismo de ação de FGAL responsável por sua ação antinociceptiva, o ensaio de inibição de ciclooxigenase (COX) *in vitro* e a análise da atividade sequestrante radicalar através do método fotolorimétrico de consumo de 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH) foram utilizados. As fases aquosa e acetato de etila (100 mg/kg, v.o.); e o flavonoide FGAL (100 µmol/kg, v.o. ou i.p.) reduziram a nocicepção produzida por ácido acético, na proporção de $49,9 \pm 11,2$, $54,6 \pm 5,3$, $39,0 \pm 6,8$ e $64,8\% \pm 8,1$, respectivamente. Por FGAL apresentar maior atividade antinociceptiva ao ser administrado pela via intraperitoneal quando comparado com a via oral, escolheu-se essa via para dar sequência ao estudo com FGAL. Posteriormente, verificou-se também a inibição da nocicepção no ensaio de placa quente através do tratamento com a fase acetato de etila (v.o., 100 mg/kg), indicando que esta fase apresenta atividade central. A fase acetato de etila (v.o., 100 mg/kg) reduziu a nocicepção gerada pela aplicação de formalina em ambas as fases do teste, apresentando porcentagem de inibição de $40,2 \pm 10,3$ e $59,9\% \pm 6,5$, respectivamente. O tratamento com a fase aquosa (100 mg/kg, v.o.) e FGAL (100 µmol/kg, i.p.) apenas se mostraram ativos na segunda fase do teste de formalina na proporção de $72,6 \pm 5,5$ e $66,0\% \pm 8,0$, respectivamente. Além disso, as fases aquosa (100 mg/kg, v.o.), acetato de etila (100 mg/kg, v.o.) e FGAL (100 µmol/kg, i.p.) também apresentaram efeito anti-inflamatório significativo quando comparadas ao grupo controle, apresentando porcentagem de inibição de recrutamento celular na peritonite induzida por zymosan A de $35,8 \pm 4,9$, $37,7 \pm 6,2$ e $31,3\% \pm 13,3$, respectivamente. FGAL, na concentração de 0,2 µM inibiu COX-1 ($79,5\% \pm 0,6$) e COX-2 ($56,0\% \pm 3,8$), com um perfil de inibição similar ao observado para indometacina na mesma concentração ($93,0 \pm 2,6$ e $79,0\% \pm 1,5$, respectivamente), apresentando inibição de COX-1 em maior proporção do que COX-2. Além disso, indometacina inibiu de forma mais eficaz, tanto COX-1 como COX-2 quando comparado a FGAL. No teste de 2,2-difenil-1-picrihidrazila (DPPH), FGAL, na concentração de 0,3 mM, mostrou alta atividade sequestrante radicalar. Estes resultados inferem que a fase aquosa, a fase acetato e FGAL obtidos das partes aéreas de *Piptadeniastipulacea* são capazes de modular a antinocicepção e a resposta inflamatória aguda. O flavonoide FGAL inibe COX-1 e COX-2, provavelmente por sua capacidade de sequestrar radicais livres, sendo este um dos seus mecanismos de ação na nocicepção e inflamação. Além disso, os resultados encontrados corroboram com o uso popular de *Piptadenia stipulacea* por suas propriedades anti-inflamatórias.

Palavras-chave: *Piptadenia stipulacea*. Galletina 3,6-dimetil éter. Atividade antinociceptiva. Atividade anti-inflamatória. Inibição de COX. Sequestro radicalar

QUEIROZ, A.C. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (Fabaceae) e inibição de cox por galetina 3,6-dimetil éter (FGAL)**, 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal de Alagoas, 2011.

ABSTRACT

Piptadenia stipulacea belongs to the Fabaceae family, and is widely distributed in the caatinga. This species is commonly known in the Brazilian Northeast as “jurema-branca”, “carcará” and “rasga-beiço”, and is used in folk medicine in inflammation. In this study, we attempted to identify the possible antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous phase, the ethyl acetate phase and one flavonoid obtained from aerial parts of *Piptadenia stipulacea*. Aerial parts of *Piptadenia stipulacea* were used and after fractionation, the flavonoid Galetin 3,6-dimethyl ether (FGAL) was obtained of the chloroformic phase of this plant. Experiments were conducted on Swiss mice using the acetic acid-induced writhing test, the hot plate test, the formalin test and zymosan A-induced peritonitis test. To characterize the mechanism(s) responsible for these antinociceptive and anti-inflammatory actions of FGAL, COX inhibitor screening assay kit and test of DPPH was used. The aqueous and ethyl acetate phases (100 mg/kg, p.o.); and the flavonoid FGAL (100 µmol/kg, p.o. or i.p.), reduced the nociception produced by acetic acid, by $49,9 \pm 11,2$, $54,6 \pm 5,3$, $39,0 \pm 6,8$ and $64,8\% \pm 8,1$, respectively. As FGAL have greater antinociceptive activity when administered intraperitoneally compared to oral route, we chose this route you follow up the study with FGAL. The ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) reduced nociception in the hot plate, indicating that this fraction exhibited central activity. The ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) reduced the formalin effects in both phases by $40,2 \pm 10,3$ and $59,9\% \pm 6,5$, respectively. Treatment with the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.) and FGAL (100 µmol/kg, i.p.) only protected the second phase by $78,5 \pm 5,5$ and $64,0\% \pm 8,0$, respectively. In addition, it was observed in the zymosan A-induced peritonitis test that the aqueous phase, the ethyl acetate phase and FGAL exhibited anti-inflammatory activity, reducing significantly the number of recruit cells by $35,8 \pm 4,9$, $37,7 \pm 6,2$ and $31,3\% \pm 13,3$, respectively. Moreover, FGAL at 0,2 µM was able to inhibit COX-1 ($79,5\% \pm 0,6$) and COX-2 ($56,0\% \pm 3,8$), with an inhibition profile similar to indomethacin in the same concentration ($93,0 \pm 2,6$ and $79,0 \pm 1,5\%$, respectively), showing inhibition of COX-1 in greater proportion than COX-2. Furthermore, indomethacin was more effective, both COX-1 and COX-2 when compared to FGAL. In the test of DPPH, FGAL showed high radical scavenging activity. These results infer that the aqueous phase, the ethyl acetate phase and FGAL obtained from aerial parts of *Piptadenia stipulacea* are able to modulate the peripheral nociception and acute inflammatory response. The flavonoid FGAL inhibit COX-1 and COX-2, probably for its ability to scavenge free radicals, this being one of its mechanisms of action in nociception and inflammation. Moreover, the results corroborate the popular use of *Piptadenia stipulacea* by their anti-inflammatory property.

Keywords: *Piptadenia stipulacea*. Galetin 3,6-dimethyl ether. Activity Antinociceptive. Activity anti-inflammatory. Inhibition of COX. Radical scavenger

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese de prostanoídes através da ação da COX	31
Figura 2. Genes que codificam COX-1 e COX-2 originam enzimas COXs constitutivas e induzidas envolvidas na homeostasia normal e em processos fisiopatológicos.....	34
Figura 3. Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico e posterior formação de leucotrienos.....	35
Figura 4. Reação catalisada pela NOS	36
Figura 5. <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth.) Ducke	48
Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides.....	50
Figura 7. Classificação dos flavonoides	51
Figura 8. Flavonoides com atividade antioxidante inibem COX através do sequestro de radicais livres.....	53
Figure 9. Estrutura química do flavonoide FGAL.....	56
Figura 10. Esquematização da etapa de biossíntese de PG do ensaio de avaliação da atividade inibitória de COX	60
Figura 11. Esquematização da placa de imunoensaio utilizada para realização do ensaio de avaliação da inibição de COX	61
Figura 12. Efeito antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/Kg, v.o.), FGAL (100 µmol/ kg, v.o. e i.p.) de <i>Piptadeniastipulacea</i> e dipirona (100 µmol/ kg, v.o. e i.p.) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético.....	67
Figura 13. Perfil antihiperálgico da fase aquosa (100 mg/ kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/ kg, v.o.), FGAL (100 µmol/ kg, i.p.) de <i>Piptadeniastipulacea</i> e morfina (15 µmol/ kg, s.c.) no ensaio da placa quente	67
Figuras 14A e 14B. Perfil antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/ kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/ kg, v.o.), FGAL (100 µmol/ kg, i.p.) de <i>Piptadeniastipulacea</i> e indometacina (100 µmol/ kg, v.o. e i.p.) no teste de formalina (1ª fase – 22A e 2ª fase – 22B)	68
Figura 15. Perfil anti-inflamatório da fase aquosa (100 mg/Kg, v.o.), fase acetato (100 mg/ kg, v.o.), FGAL (100 µmol/ kg, i.p.) de <i>Piptadeniastipulacea</i> e indometacina (100 µmol/ kg, v.o. e i.p.) no ensaio de peritonite induzida por zymosanA	69
Figura 16. Inibição <i>in vitro</i> das enzimas COX-1/COX ovinas por FGAL e Indometacina, ambas nas concentrações de 0,2 µM	69
Figura 17. Atividade sequestrante de radicais de FGAL, flavonoide isolado das partes a de <i>Piptadeniastipulaceae</i> do controle ácido gálico, todos na concentração de 0,3 mM	
Figura 18. Esquema da hipótese do mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória de FGAL. FGAL inibe COX, além de possuir atividade sequestrante radicalar, apresentando propriedades contra inflamação e nocicepção inflamatória	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções e materiais utilizados nos ensaios farmacológicos	55
Tabela 2. Equipamentos utilizados nos ensaios farmacológicos	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ASICs	Canais iônicos sensíveis à ácido
BH ₄	Tetraidrobiopterina
CCK	Colecistocinina
CGRP	Peptídio relacionado ao gen da calcitonina
COX	Cicloxigenase
cNOS	Sintase do óxido nítrico constitutiva
DP	Receptor de prostaglandina D
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picriidrazila
eNOS	Sintase do óxido nítrico endotelial
EP	Receptor de prostaglandina E
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FGAL	Flavonoide galeatina 3,6-dimetil éter
FMN	Flavinamononucleotídeo
FP	Receptor de prostaglandina F
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Sintase do óxido nítrico induzível
IP	Receptor de Prostaglandina I
i.p.	Via de administração intraperitoneal
Liso-PAF	Lisogliceril-fosforilcolina
LOX	Lipoxigenase
LTs	Leucotrienos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosforeduzida
NF-κB	Fator Nuclear de Transcrição Kappa B
NKA	Neurocinina A

NKB	Neurocinina B
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
nNOS	Óxido nítrico-sintase constitutiva neuronal
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ • ⁻	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxila
PAF	Fator de agregação de plaquetas
PG	Prostaglandina
PKC	Proteína cinase C
PMNs	Polimorfonucleares
PPAR _γ	Receptor ativado do proliferador de peroxissoma gama
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Via de administração sub-cutânea
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP	Receptor de tramboxano
TPG	Transportadores de prostaglandinas
TX	Tramboxano
v.o.	Via de administração oral
VR-1	Receptor vaniloide-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	172
OBJETIVOS	192.1
Objetivo geral	192.2
Objetivos específicos	193
REVISÃO DA LITERATURA	203.1
Dor e nocicepção	20
3.1.1 Mecanismos neurais da dor	223.2
Dor e inflamação	253.3
Mediadores inflamatórios	27
3.3.1 Aminas vasoativas	27
3.3.2 Peptídeos vasoativos	28
3.3.2.1 Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina e taquicininas	28
3.3.2.2 Proteases plasmáticas	29
3.3.3 Metabólitos do ácido araquidônico	29
3.3.4 Óxido nítrico	36
3.3.5 Citocinas e quimiocinas	
3.4 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios	39
3.4.1 Analgésicos opióides	39
3.4.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais	40
3.4.3 Anti-inflamatórios esteroidais	
3.5 Uso de plantas na medicina popular	
3.6 Considerações sobre a família Fabaceae	44
3.6.1 Subfamília Mimosoidea e gênero <i>Piptadenia</i>	
3.6.2 Considerações botânicas sobre a espécie <i>Piptadenia stipulacea</i> (Benth) Ducke e suas atividades biológicas	
3.7 Aspectos gerais dos flavonóides	50
3.7.1 Considerações sobre a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos flavonóides	524
MATERIAIS E MÉTODOS	554.1
Materiais	55
4.1.1 Materiais e soluções utilizados	55
4.1.2 Equipamentos utilizados	55
4.1.3 Fases e substância obtidas de <i>Piptadenia stipulacea</i>	

564.2 Metodologia	56
4.2.1 Animais	56
4.2.2 Fases e substâncias utilizadas	56
4.2.3 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético	57
4.2.4 Ensaio da placa quente (hotplate test)	57
4.2.5 Teste de formalina	58
4.2.6 Ensaio de peritonite induzida por zymosan A	58
4.2.7 Ensaio de avaliação de inibição de COX <i>in vitro</i>	
584.2.7.1 Biossíntese de prostaglandina	
59 4.2.7.2 Ensaio imunoenzimático	
604.2.8 Análise quantitativa da atividade sequestrante radicalar	61
4.2.8.1 Construção da curva de calibração do DPPH	61
4.2.8.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras	62
4.2.9 Análise Estatística	
635 RESULTADOS	645.1
Atividade antinociceptiva de <i>Piptadenia stipulacea</i> no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético	645.2
Atividade antinociceptivacebral da fase acetato de etila de <i>Piptadenia stipulacea</i> no ensaio da placa quente (hotplate test)	645.3
Atividade antinociceptiva de <i>Piptadenia stipulacea</i> no teste de formalina	655.4
Atividade anti-inflamatória de <i>Piptadenia stipulacea</i> no ensaio de peritonite induzida por zymosan A	655.5
Inibição de COX <i>in vitro</i> através da ação de FGAL	665.6
Atividade sequestrante radicalar de FGAL no método fotolorimétrico do DPPT	
666 DISCUSSÃO	717
CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta imediata do corpo desencadeada pelo dano devido à presença de patógenos, substâncias tóxicas ou agressão física (WEISS, 2008). Os processos inflamatórios são necessários à vigilância imunológica, reparação ótima, e regeneração após a lesão (VODOVOTZ et al., 2008). No entanto, a inflamação excessiva ou inadequada é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite reumatoide, psoríase e doença inflamatória intestinal. A inflamação é o maior componente dos danos causados por doenças auto-imunes e um colaborador essencial para doenças como câncer, diabetes e doença cardiovascular (LUCAS et al., 2006).

Localmente, a inflamação se desenvolve nas formas clássicas de inchaço, calor, rubor e muitas vezes dor. Os indutores comuns de inflamação compreendem uma grande variedade de condições adversas que iniciam o recrutamento dos leucócitos, indução e ativação de mediadores inflamatórios, como cininas, produtos da COX e citocinas. Muitas dessas moléculas são produzidas localmente e têm comprovado envolvimento no processo inflamatório dos tecidos, e são os principais alvos para a intervenção terapêutica em uma variedade de doenças (LUCAS et al., 2006; MEDZHITOV, 2008). A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório em que a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum. Esta sensibilização causa hiperalgesia ou alodinia em seres humanos, fenômenos que envolvem a percepção da dor, e é mais bem descrita como nocicepção em modelos animais (VERRI-JÚNIOR et al., 2006; CUNHA et al., 2008).

O tratamento clínico das doenças inflamatórias é dependente de fármacos que pertencem à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e esteroidais (YONATHAN et al., 2006). A constante busca por agentes anti-inflamatórios potencialmente eficazes e seguros não pode ser subenfatizada. O uso de extratos de ervas e suplementos nutricionais como medicina alternativa ou complementar à quimioterapia convencional para o tratamento de processos inflamatórios está bem documentada na medicina Ayurveda (RAO et al., 2005).

A espécie *Piptadenia stipulacea* (Família: Fabaceae: subfamília Mimosoideae: tribo Mimoseae) tem dois sinônimos, *Piptadenia communis* var. *stipulacea* Benth e *Pityrocarpa stipulacea* (Benth) Brenan, apresenta uma única investigação fitoquímica, a qual descreve apenas o isolamento do alcaloide indólico bufotenina de *Piptadenia communis* (WILLAMAN; LI, 1970). *Piptadenia stipulacea* é popularmente conhecida no Nordeste do Brasil como "jurema-branca" (FABRICANTE; ANDRADE, 2007), "jurema malícia-da-

serra", "carcará" e "calumbi" (FLORENTINO et al., 2007) e é amplamente distribuída no bioma caatinga do nordeste, desde do estado do Piauí até a Bahia (BARBOSA et al., 2007). É comumente utilizada como alimento para ovinos, caprinos e bovinos, principalmente durante a estação seca, quando não há pasto (BEZERRA, 2008).

O caule, casca e folhas de *Piptadenia stipulacea* são usados na medicina popular nas formas de tintura ou decocção por suas propriedades anti-inflamatórias (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002). Essas preparações também são indicadas como cicatrizante (BEZERRA, 2008). Em estudos farmacológicos de *Piptadenia stipulacea*, suas folhas foram ativas contra *Klebsiella pneumoniae* multirresistente contra cepas de *Candida albicans* (BEZERRA, 2008). Em outro estudo, extratos de *Piptadenia stipulacea* também mostraram eficazes contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium* e *Neurospora crassa* (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984).

Esse estudo teve por objetivo avaliar as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da fase aquosa, da fase acetato de etila em modelos animais. Devido ao fato da fase clorofórmio ter apresentado alto teor de fenóis totais, esta foi selecionada para fracionamento, utilizando cromatografia de coluna de adsorção, que levou ao isolamento e identificação do flavonoide FGAL (galetina 3,6-dimetil eter). Os flavonoides são exemplos de compostos isolados de plantas normalmente relatados por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (HÄMÄLÄINEN et al., 2007). Esses compostos fenólicos ocorrem em alimentos de origem vegetal de forma ubíqua. Mais de 4000 flavonoides têm sido descritos e são constituintes normais da dieta humana conhecidos pela sua variedade de atividades biológicas (GUARDIA et al., 2001; HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Embora flavonoides não sejam tão raros dentro da Fabaceae, FGAL foi isolado pela primeira vez nesta família e mostrou algumas propriedades farmacológicas, como um inibidor da aldose reductase (HAI-BO et al., 2007), atividade antioxidante (LEACH et al., 2007), inibidor da α -amilase (AL-DABBA et al., 2006), inibidor da produção de óxido nítrico (NO) (MORIKAWA et al., 2006), atividade contra doenças vasculares neurais e periféricas (ROSENBLOOM, 2004), para tratar doenças da pele (ROSENBLOOM, 2003), e como antiviral (ELSOHLY et al., 1997). Testes farmacológicos foram utilizados para verificar se este flavonoide apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, bem como para pesquisar seus prováveis mecanismos de ação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Pesquisar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fase aquosa, fase acetato de etila e do flavonoide FGAL isolado das partes aéreas da espécie *Piptadenia stipulacea*.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção;
- Averiguar uma possível ação antinociceptiva central no modelo de placa quente;
- Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação aguda;
- Verificar a atividade inibitória de COX-1/COX-2 *in vitro*;
- Analisar a atividade sequestrante radicalar em ensaio *in vitro*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Dor e nocicepção

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo (BASBAUM et al., 2009). O sistema nervoso sensorial é especializado em detectar e reagir a estímulos externos e, dependendo da evolução da complexidade genética característica de cada espécie, as proteínas transdutoras possibilitam diferenciar o estímulo agressivo do inócuo (RIBEIRO et al., 2002; KRAYCHETE et al., 2006).

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou real (LIMA-JÚNIOR, 2005). Assim como a beleza não é inerente a uma imagem visual, a dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução dos estímulos de substâncias nocivas do ambiente, processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já a nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos, ou químicos intensos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, denominadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009).

O sistema nervoso pode alterar os seus níveis de atividade em resposta a um estímulo nociceptivo, não sendo apenas um condutor de estímulos, mas sim reagindo a eles quando persistentes, modificando-se anatômica e funcionalmente (neuroplasticidade) e também armazenando estas informações (memória) (BARROS, 2004). Os estímulos dolorosos são detectados e codificados, principalmente, por nociceptores aferentes, que transmitem informações nocivas a medula espinal e ao cérebro (IVERSEN; CHAPMAN, 2002).

O sistema nervoso detecta e interpreta uma ampla gama de estímulos térmicos e mecânicos, bem como químicos, ambientais e endógenos. Quando intensos, esses estímulos geram dor aguda, e na continuação dos danos persistentes, tanto componentes periféricos como do sistema nervoso central (SNC) da dor apresentam enorme plasticidade nas vias de transmissão, aumentando os sinais de dor e produção de hipersensibilidade. Quando a plasticidade facilita reflexos protetores, pode haver benefícios, mas quando as alterações persistem, pode-se resultar em uma condição de dor crônica (BASBAUM et al., 2009).

Além disso, quando estímulos dolorosos provocam dor de maior intensidade, há a indução da chamada hiperalgesia. Já quando estímulos normalmente inócuos, como toque, luz ou calor, são percebidos como dolorosos este fenômeno é referido como alodinia

(BASBAUM et al., 2009). A alodinia pode resultar de duas situações diferentes: aumento da resposta dos neurônios da medula espinal à transmissão da dor (sensibilização central), ou redução dos limiares de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os receptores nervosos periféricos da dor foram se desenvolvendo ao longo do tempo, de maneira a ampliar e facilitar a condução nervosa após estímulo de alto limiar, com o objetivo de evitar situações desagradáveis, manter as funções fisiológicas e preservar a vida. Entretanto, embora seja um processo natural, a dor é sempre referida como uma sensação desagradável e por vezes insuportável (RIBEIRO et al., 2002; KRAYCHETE et al., 2006).

A dor aguda, com sua função biológica, alerta para a presença de uma lesão tecidual real ou potencial. Em determinadas situações, sua intensidade e duração não mantêm uma relação de proporcionalidade com o estímulo agressor. Diversos são os neuromediadores inflamatórios que, quando liberados de macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam os nociceptores nas fibras nervosas tipos A δ e C, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia (RIBEIRO et al., 2002; KRAYCHETE et al., 2006).

A história de trauma, de infecções virais, de doenças vasculares, de distúrbios endócrinos ou metabólicos, de deficiência nutricional, de processos inflamatórios ou auto-imunes contribui de forma evidente para a lesão ou estimulação do sistema nervoso. Dessa forma, as alterações da localização e da expressão de canais iônicos, de receptores e de sinapses nervosas e as mudanças da distribuição e da cinética de neurotransmissores e de neuromediadores permitem que os neurônios centrais ou periféricos atinjam o limiar para despolarização mais precocemente, gerando descargas ectópicas que se amplificam e ativam células vizinhas. Pode-se inferir, então, que a dor crônica é um estado de constante facilitação da condução nervosa, quando estímulos que eram inócuos podem ser interpretados como dor (alodinia) ou quando a resposta ao estímulo doloroso não é proporcional à intensidade da agressão (hiperalgesia) (KRAYCHETE et al., 2006).

A dor crônica, resultante da persistência de estímulos nociceptivos ou disfunções do sistema nervoso, não é uma versão prolongada de dor aguda, sendo identificada a perda da função biológica e se caracteriza pela sua natureza multidimensional, em que, além dos fenômenos neurofisiológicos, os aspectos psicológicos, cognitivos, comportamentais, sociais, familiares e vocacionais também modulam a experiência dolorosa (RIBEIRO et al., 2002).

Os quadros álgicos podem ser classificados ainda de acordo com a sua origem. Quando a dor ocorre em consequência de lesão tecidual, secundária a um estímulo (calor,

pressão, corte) ou provocada por uma doença, a dor é chamada de nociceptiva. Neste caso, o fenômeno é associado à inflamação do tecido danificado e o sistema nociceptivo fica mais sensível. Com a resolução do dano tecidual, o estímulo termina. A crise álgica está dentro do grupo de dores nociceptivas, que podem ser do tipo somática (constante e bem localizada, por ativação de nociceptores) ou visceral (constante, mal localizada, seu mecanismo envolve a ativação de nociceptores e/ou componentes autonômicos) (LOBO et al., 2007).

A dor neuropática ocorre quando os axomas sensoriais ou as células nervosas estão danificados, causando uma mudança no sistema nervoso por hipersensibilidade, seja na área lesada ou no tecido circundante. A dor, nestes casos, tem característica de queimação, choque ou disestesia. O mecanismo deste tipo de dor não é nociceptivo, mas por descargas paroxísticas do SNC e periférico (LOBO et al., 2007).

3.1.1 Mecanismos neurais da dor

A percepção da dor inicia com a resposta de fibras aferentes do tipo A δ ou fibras C a vários estímulos (químicos, térmicos ou mecânicos), intensos suficientes para desencadear um potencial de ação (OLIVEIRA, 2005a). As fibras aferentes do tipo A δ são pequenas fibras mielinizadas de diâmetro médio que mediam rapidamente a dor aguda, bem localizada. Esses aferentes mielinizados diferem consideravelmente das fibras de maior diâmetro A β , que rapidamente respondem a estímulos mecânicos inócuos (BASBAUM et al., 2009).

A segunda classe de nociceptor inclui fibras aferentes de pequeno diâmetro não mielinizadas, conhecidas como nociceptores polimodais C ou fibras C, as quais transmitem lentamente a dor mal localizada. Como os aferentes mielinizados, a maioria das fibras C são polimodais, isto é, inclui uma população que é sensível tanto ao calor como a estímulos mecânicos nocivos. Outros são mecanicamente insensíveis, mas respondem ao calor nocivo. As fibras C também respondem a estímulos químicos nocivos, tal como o ácido ou a capsaicina, o ingrediente picante na pimenta malagueta. É interessante mencionar também que nem todas as fibras C são nociceptores (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM et al., 2009).

Existem duas classes principais de nociceptores, que se subdividem em fibras somáticas e viscerais, innervando todos os tecidos, exceto o SNC. Os neurônios nociceptivos, os quais respondem a estímulos nocivos, apresentam seus corpos celulares dentro do gânglio da raiz dorsal da medula, na cadeia para-vertebral e no gânglio trigeminal para os nociceptores do rosto (OLIVEIRA, 2005a; BASBAUM et al., 2009).

Os corpos celulares dos nociceptores dão origem a um único axônio que se bifurca em um ramo periférico (que inerva o tecido-alvo periférico) e um axônio central (que entra no CNS para fazer a sinapse nociceptiva com neurônios de segunda ordem). Logo, os nociceptores têm quatro principais componentes funcionais: o terminal periférico, que transduz estímulos externos e inicia os potenciais de ação; o axônio que conduz os potenciais de ação; o corpo celular que controla a identidade e a integridade do neurônio; e o terminal central, que é o elemento pré-sináptico da primeira sinapse na via sensorial no CNS (WOOLF; MA, 2007).

Enquanto que apenas o terminal periférico dos nociceptores irá responder aos estímulos do ambiente (calor doloroso, frio e estímulo mecânico), tanto os terminais periféricos como os centrais podem ser alvo de uma série de moléculas endógenas (como pH, lipídios e neurotransmissores) que regulam a sua sensibilidade (BASBAUM et al., 2009).

Na sensibilização central, a dor pode ser produzida pela atividade em fibras sensoriais nociceptivas não-primárias. A sensibilização periférica é produzida quando os terminais nociceptores ficam expostos a produtos de dano tecidual e inflamação (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A sensibilização periférica representa uma forma de estímulos evocados pela plasticidade funcional do nociceptor. O estímulo nesta situação é um conjunto de mediadores inflamatórios liberados a partir de células lesadas e inflamatórias, que reduzem o limiar dos nociceptores. Essencialmente no sítio inflamatório, como resultado da mudança no ambiente químico produzido pelo rompimento das células, degranulação de mastócitos, secreção por células inflamatórias e indução de enzimas como COX-2, há mudança nos nociceptores que, ao invés de serem exclusivamente detectores de estímulos nocivos, passam a detectar também estímulos inócuos. Como resultado, os estímulos de baixa intensidade acessam a via nociceptiva e começam a produzir dor. Uma ampla gama de mediadores é responsáveis por esse processo, inclusive cininas, aminas, prostanoídes, fatores de crescimento, citocinas. Esses mediadores ativam um grande número de classes de receptores, que ativam uma infinidade de cascatas de sinalização (HUCHO; LEVINE, 2007; WOOLF; MA, 2007).

Todos os sistemas sensoriais devem converter estímulos ambientais em sinais eletroquímicos. Comparado com neurônios sensoriais de outros sistemas, os nociceptores devem ser equipados com um repertório diversificado de dispositivos de transdução (JULIUS; BASBAUM, 2001). Uma vez que os sinais nociceptivos foram transduzidos pelo terminal aferente primário, há a ativação de uma variedade de canais iônicos dependentes de voltagem,

fundamentais para a geração de potenciais de ação, que transmitem sinais nociceptivos através de sinapses no corno dorsal (BASBAUM et al., 2009).

Os terminais centrais de nociceptores estão localizados na superfície do corno dorsal da medula espinal para neurônios somáticos e no núcleo espinal do trigêmeo para aqueles que inervam da face. Estes terminais comandam as informações sinápticas de entrada para os neurônios de segunda ordem, transferindo informações sobre a intensidade e a duração através dos estímulos periféricos nociceptivos (WOOLF; MA, 2007). Todos os neurônios sensoriais primários fazem conexões sinápticas com neurônios na substância cinzenta no corno dorsal da medula espinal (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Diversos neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos são liberados pelos terminais dos aferentes primários no corno dorsal da medula, onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva. Entre tais substâncias, destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicininas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídeo relacionado ao gen da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, NO, prostaglandinas (PGs), galanina, encefalinas e endorfinas] (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A liberação do neurotransmissor é regulada por múltiplos fatores de controle que modulam o influxo de cálcio em resposta à invasão do terminal por potenciais de ação para ativar a liberação das vesículas (WOOLF; MA, 2007). Após sofrer as influências de modulação do corno dorsal, alguns impulsos nociceptivos passam diretamente ou através de interneurônios para as células do corno anterior e anterolateral onde estimulam neurônios somatomotores e pré-ganglionares simpáticos, provocando resposta nociceptiva segmentar autonômica reflexa. Outros impulsos nociceptivos são transmitidos para neurônios que fazem sinapse com neurônios dos sistemas ascendentes que convergem para o tronco encefálico e estruturas supraespinhais, onde promovem respostas reflexas supra segmentares e corticais (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

As conexões das fibras ascendentes no seu caminho para o córtex são responsáveis pela ativação de áreas responsáveis pela dimensão sensitivo-discriminativa, que permite identificar a dor no tempo e no espaço, dimensão afetivo-motivacional, que atribui à conotação aversiva desagradável, e à dimensão cognitivo-avaliativa, que possibilita quantificá-la e atribuir-lhe significado simbólico individual (BARROS, 2004).

As principais vias ascendentes da dor são as vias espinotalâmica e espinoparabraquial, que transportam mensagens de dor para o tálamo e tronco cerebral, respectivamente. Além

disso, a primeira via é particularmente relevante para os aspectos sensório-discriminativo da experiência dor (localização e intensidade do estímulo), enquanto a segunda pode ser mais relevante para dores mal localizadas (IVERSEN; CHAPMAN, 2002; BASBAUM et al., 2009).

A partir do tronco encefálico e do tálamo, a informação chegam a estruturas corticais. Não há nenhuma área do cérebro essencialmente única para a dor. Pelo contrário, os resultados da dor a partir da ativação de um grupo distribuído de estruturas, algumas das quais são mais associados com as propriedades sensoriais-discriminativas (tais como o córtex somatosensorial) e outros com os aspectos emocionais (como o cíngulo anterior e córtex insular) (BASBAUM et al., 2009).

3.2 Dor e inflamação

A inflamação é o mecanismo básico disponível para o reparo tecidual após uma lesão ou infecção, com o objetivo de remover e reparar o tecido danificado. A resposta inflamatória é uma reação da microcirculação, que é caracterizada pela translocação de proteínas séricas e migração de leucócitos do sangue para a área de injúria. Esses fenômenos são regulados pela liberação sequencial de substâncias vasoativas e mediadores quimiotáticos, que contribuem para os sinais cardinais da inflamação, os quais são calor, rubor, edema, dor e perda de função do tecido (LAWRENCE et al., 2002; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

A dor aguda inflamatória é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização dos neurônios sensoriais primários nociceptivos, também conhecido como hiperalgesia ou alodinia. Após a lesão tecidual, são liberados mediadores primários, que atuam sobre receptores metabotrópicos na membrana neuronal para desencadear a ativação de vias de segundos mensageiros. Na última década, tem sido demonstrado que estímulos inflamatórios não estimulam diretamente a liberação de mediadores primários hipernociceptivos, mas que a sua libertação é precedida por uma cascata de citocinas (CUNHA et al., 2005).

Os eicosanoides e as aminas simpáticas são os mediadores primários mais importantes. Estes mediadores ativam vias de segundos mensageiros, tais como AMPc, proteína cinase A e a proteína cinase C (PKC), responsáveis pela redução do limiar de nociceptores, aumentando assim a excitabilidade da membrana neuronal. Neste estado, a ativação e transmissão do impulso pelos neurônios nociceptivos primários são facilitadas (CUNHA et al., 2005).

A vasodilatação local aumenta o fluxo sanguíneo regional para a área inflamada e, juntamente com um aumento da permeabilidade microvascular, resulta na perda de líquidos e

proteínas plasmáticas do sangue para o tecido extravascular. Concomitantemente, há um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e da liberação de fatores quimiotáticos do local injuriado, que facilita a aderência de células circulantes ao endotélio vascular e sua migração para a área afetada. Estes eventos resultam em um predomínio de neutrófilos na área inflamada no início da lesão, que posteriormente são progressivamente substituídos por células mononucleares, principalmente, os monócitos, que depois se diferenciam em macrófagos. Essas células fagocíticas além de ingerirem estímulos nocivos como microrganismos e restos celulares, também liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas, que geram espécies reativas de oxigênio (ROS) (LAWRENCE et al., 2002).

Essa resposta exige imunidade inata e, em alguns casos, uma resposta imune adaptativa, que são os dois principais componentes integrantes do sistema de defesa do hospedeiro. A imunidade inata não só atua como primeira linha de defesa contra injúria, mas após o reconhecimento de um estímulo adequado, fornece os sinais necessários para instruir o sistema imune adaptativo para desenvolver uma resposta que tende a limitar os efeitos da agressão. Por sua vez, a resposta adaptativa depende do sistema imune inato para fornecer os efetores necessários, sob a forma de fagocíticos e granulócitos, para extinguir o fator de risco (LAWRENCE et al., 2002).

Idealmente, a resposta inflamatória aguda termina quando a homeostase é restabelecida, após eliminação do estímulo nocivo. No entanto, quando o fator de risco continua a existir, a inflamação aguda deixa de ser um evento benéfico e evolui para inflamação crônica (LAWRENCE et al., 2002; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; WU; WU, 2007; KIELLAND; CARLSEN, 2010).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta imune. Nas inflamações crônicas, além dos fenômenos exsudativos, estão presentes também os fenômenos produtivos, que consistem na proliferação de vasos e fibroblastos, como também na migração e proliferação de monócitos e linfócitos (SILVA et al., 2002).

Os mecanismos moleculares de doenças inflamatórias crônicas, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal, envolvem a infiltração e a ativação de processos inflamatórios e muitas células do sistema imunológico, que liberam vários mediadores inflamatórios que interagem e ativam as células estruturais no sítio inflamatório. O padrão de inflamação difere claramente entre estas doenças, com a participação de várias células e mediadores, mas todas são caracterizadas por aumento da expressão de várias proteínas inflamatórias, algumas das quais são comuns a

todas as doenças inflamatórias, enquanto outras são mais específicas para uma determinada doença. Essa expressão aumentada de múltiplos genes inflamatórios característica da inflamação crônica é regulada por fatores de transcrição pró-inflamatórios, tais como fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BARNES, 2006).

O número crescente de relatos na literatura tem enfatizado o fato de que a inflamação, especialmente, a inflamação crônica, desempenha um papel importante na patogênese e progressão de doenças inflamatórias, incluindo as doenças degenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, insuficiência renal e DPOC (WU; WU, 2007).

A complexidade da resposta inflamatória exige que muitos de seus elementos funcionais sejam controlados coordenadamente em algumas situações e de forma independente, em outras. Esta regulação ocorre através da especificidade das células recrutadas e sua diferenciação, da sinalização e da expressão gênica (KIELLAND; CARLSEN, 2010).

3.3 Mediadores inflamatórios

Os indutores da inflamação desencadeiam a produção de inúmeros mediadores inflamatórios, que por sua vez, alteram a funcionalidade de muitos tecidos e órgãos. Muitos desses mediadores inflamatórios têm efeitos em comum, na vasculatura e sobre o recrutamento de leucócitos. Esses mediadores podem ser derivados de proteínas do plasma ou secretados por células. Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de acordo com as suas características bioquímicas em: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, NO, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008).

3.3.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) têm sido classicamente envolvidas no processo de nocicepção em várias condições inflamatórias. O envolvimento desses mediadores em alterações vasculares, formação de edema e coceira após o desafio antigênico também está bem descrito na literatura científica (LAVICH et al., 2003).

As aminas vasoativas são produzidas, principalmente, quando mastócitos e plaquetas se degranulam. Essas substâncias apresentam complexos efeitos sobre a vasculatura,

provocando aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação ou vasoconstrição dependendo do contexto. As consequências imediatas de sua liberação pelos mastócitos podem ser altamente prejudiciais em organismos sensíveis, resultando em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008).

3.3.2 Peptídeos vasoativos

Os peptídios vasoativos podem ser armazenados de forma ativa em vesículas de secreção (por exemplo, a SP) ou gerados por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo, cininas) (MEDZHITOV, 2008).

3.3.2.1 Peptídeo relacionado ao gen da calcitonina e taquicinas

De importância primordial para geração da inflamação neurogênica são os neurônios sensoriais que possuem receptores vaniloides, os quais são ativados pela capsaicina (RICHARDSON; VASKO, 2002). Esses neurônios fazem partes de fibras nervosas do tipo C e, em menor quantidade, das fibras A δ (KALIL-GASPAR, 2003).

A capsaicina, substância irritante isolada da pimenta vermelha (*Capsidium annum*), ativa prótons do receptor vaniloide-1 (VR-1), que estão localizados em neurônios sensoriais de pequenos diâmetros (CATERINA et al., 1997). Esta interação entre capsaicina e VR-1 resulta na ativação de canais de cálcio não seletivos, que ocorre através da despolarização induzida pelo sódio, aumentando cálcio intracelular (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Além da capsaicina, outros estímulos como altas temperaturas e pH ácido e alcalino também são capazes de ativar VR-1 (DHAKA et al., 2009).

Os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina transmitem informação nociceptiva ao SNC (função aferente), enquanto que suas terminações periféricas estão relacionadas com a liberação de uma variedade de neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídios pró-inflamatórios (função eferente), onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (SZALLASI; BLUMBERG, 1996; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídios, incluindo as taquicinas, CGRP, CCK, somatostatina, NO, PGs, galanina, encefalinas e endorfinas. O CGRP e a SP são os maiores iniciadores da inflamação neurogênica, e produzem sintomas por interagirem com células endoteliais,

mastócitos, células do sistema imune e arteríolas (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; RICHARDSON; VASKO, 2002).

3.3.2.2 Proteases plasmáticas

As cininas estão implicadas em muitos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o regulamento de pressão sanguínea e homeostasia do sódio, a inflamação e efeitos cardioprotetores de pré-condicionamento (CAMPBELL, 2001). Esses peptídeos de curta duração, incluindo a bradicinina, calidina e T-cinina, são gerados durante a lesão tecidual e estímulo nocivo (COUTURE et al., 2001).

O fator Hageman tem um papel fundamental na coordenação da vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, funciona tanto como um sensor de dano vascular e como um indutor da inflamação. O fator Hageman ativa a cascata da calicreína-cinina, e o produto principal desta cascata é a bradicinina, que afeta os vasos, bem como tem uma potente ação pró-nociceptiva (MEDZHITOV, 2008)

Bradicinina e calidina são formadas após clivagem proteolítica do cininogênio plasmático ou tecidual através da ação da serina protease calicreína. Calicreína plasmática forma bradicinina a partir de cininogênio de alto peso molecular, enquanto que no tecido calicreína forma calidina a partir de cininogênio de alto peso molecular ou cininogênio de baixo peso molecular. Bradicinina também pode ser gerada por clivagem de calidina mediada por aminopeptidase (CAMPBELL, 2001; COUTURE et al., 2001; DUCHENE; AHLUWALIA, 2009).

As cininas causam a liberação de outros poderosos mediadores inflamatórios, por exemplo, as PGs, LTs, ILs, PAF e de fator de necrose tumoral (TNF) a partir de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, células endoteliais e no tecido onde está ocorrendo o processo de inflamação. Estes mediadores inflamatórios são capazes de causar proliferação de vasos, migração de células inflamatórias e, provavelmente, a angiogênese (COUTURE et al., 2001; DUCHENE; AHLUWALIA, 2009).

3.3.3 Metabólitos do ácido araquidônico

Os eicosanoides, cuja principal fonte é o ácido araquidônico livre, são agentes homeostáticos, envolvidos na manutenção da integridade dos sistemas inflamatório, cardiovascular e renal. O ácido araquidônico é um constituinte dos fosfolipídios de membrana

e, por isso, a síntese dos eicosanoides se inicia com a liberação desse ácido graxo, através de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas. Todas as células são capazes de liberar ácido araquidônico, mas os produtos enzimáticos, predominantes e assim formados, são altamente específicos a nível celular (SILVA et al., 2002).

A etapa inicial de síntese dos eicosanoides envolve a cisão do ácido araquidônico presente nos fosfolipídios das membranas celulares. A fosfolifase A_2 e a fosfolifase C e, possivelmente, a diacilglicerol lipase estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico. A forma de fosfolifase A_2 envolvida na produção de ácido araquidônico é principalmente a forma intracelular, e sua ação pode produzir não apenas ácido araquidônico livre, mas também lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF), que é o precursor de outro mediador da inflamação, o fator de agregação de plaquetas (PAF) (SILVA et al., 2002; SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003).

O metabolismo do ácido araquidônico pode ocorrer através de três vias enzimáticas distintas: o ácido araquidônico pode ser convertido no precursor de prostanoídes pela ação da COX; pode ser substrato para a lipoxigenase (LOX), levando à produção de LTs; e ainda pode ser usado como substrato da enzima esfingomielinase, que converte a esfingomielina em seramida, um mediador da apoptose (CARNEIRO et al., 2004).

O desequilíbrio na homeostase de LTs pode resultar em respostas inflamatórias com distúrbios respiratórios, como asma e rinite alérgica, artrite e desordens inflamatórias no intestino. Similarmente, um desequilíbrio na síntese de PGs pode levar a doenças cardiovasculares e renais, resultando em aterosclerose e derrames (SILVA et al., 2002).

As COXs, também conhecidas como prostaglandina H sintase (PGHS), catalisam a bis-oxigenação do ácido araquidônico através da ação de dois sítios ativos diferentes da enzima. Inicialmente, o ácido araquidônico cataliza a ciclização e oxidação para formar PGG_2 no sítio cicloxigenase da COX (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; BURIAN; GEISLINGER, 2005). O modelo mecanicista, que explica a necessidade do sítio peroxidase para oxidação do heme e para catálise cicloxigenase do ácido araquidônico está exposto na

Figura 1.

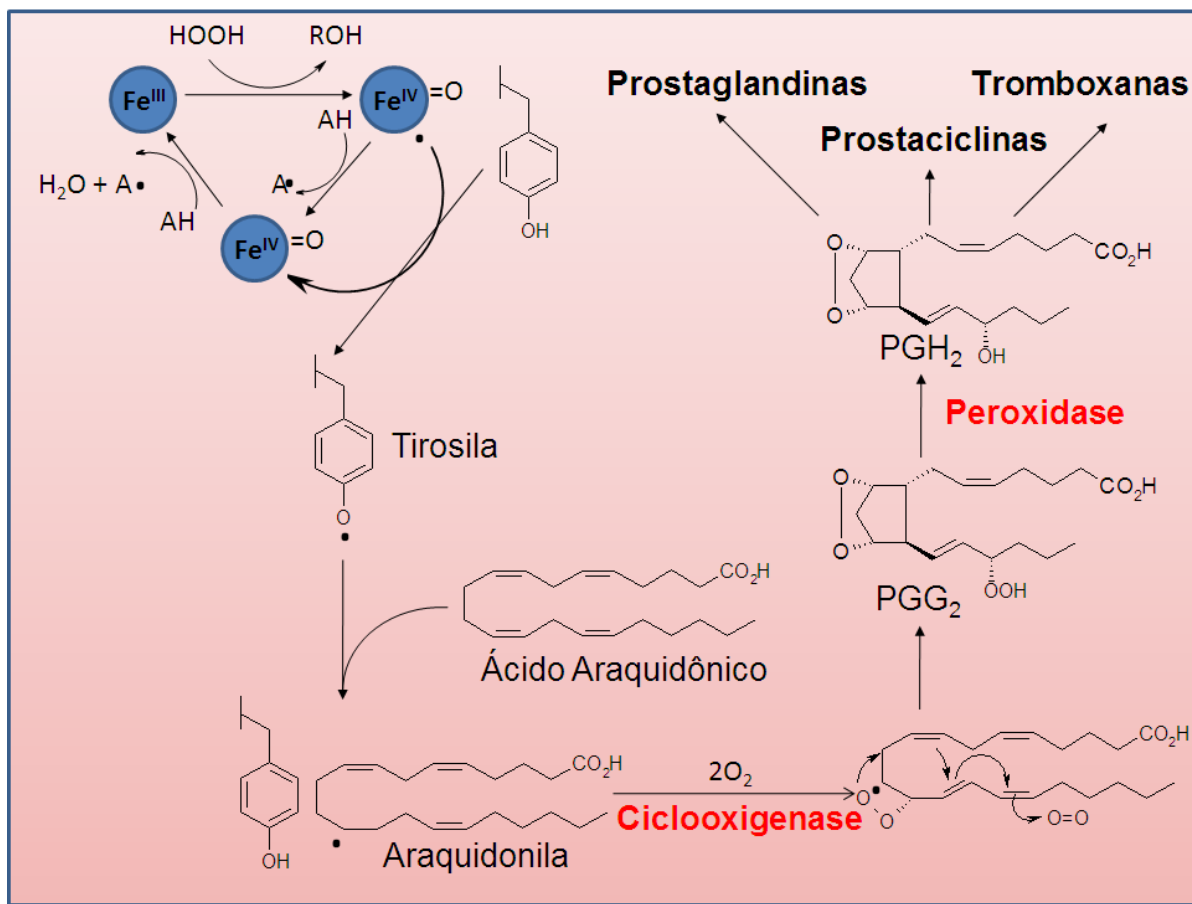


Figura 1. Síntese de prostanoídeos através da ação da COX. Adaptado de SMITH et al., 2000; ROUZER; MARNETT, 2009.

A oxidação do grupo heme no sítio peroxidase, por um hidropéroxido, gera $\text{Fe}(\text{IV})$ em um radical oxiferril, uma protoporfirina e um álcool derivado do peróxido oxidante. O radical oxiferril, por sua vez, oxida Tyr385 e cria um radical tirosil no sítio ciclooxygenase da COX, que é responsável pela formação do radical araquidonila que reage com o oxigênio molecular (O_2). As duas moléculas de O_2 atacam os carbonos 9 e 11 do radical araquidonila para a produção de PGG_2 . PGG_2 é posteriormente reduzido a PGH_2 no sítio peroxidase, com a produção de um radical livre intermediário, que rapidamente se converte em um radical hidroxila reativo ($\bullet\text{OH}$) (PASINETTI, 1998; SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; BURIAN; GEISLINGER, 2005; BINGHAM et al., 2006; ROUZER; MARNETT, 2009).

A PGH_2 serve como substrato comum de sintases específicas para a produção de PGs (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2) e tromboxanos (TXA_2 e TXB_2) (HÉTU; RIENDEAU, 2005). Estas PGs podem sofrer transporte facilitado para fora da célula por transportadores de prostaglandinas (TPG) e outros transportadores e exercer ações autócrinas ou parácrinas sobre uma família dos receptores de PG na membrana celular, que foram

nomeados DP, EP, FP, IP e TP, respectivamente. Há quatro subtipos do receptor EP (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄), dois subtipos do receptor DP (DP₁ e DP₂) e cada um dos receptores FP, IP e TP de representam os produtos de genes distintos (FUJINO; REGAN, 2003; BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

Os receptores de PGs, com exceção do DP₂ que é um receptor quimioatraente, pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína-G. Os receptores IP, DP₁, EP₂ e EP₄ são acoplados à proteína G_s e exerce seus efeito através da formação de AMPc como segundo mensageiro. Os receptores EP₁, FP e TP são acoplados à proteína G_q, cujas ações são mediadas via elevação do cálcio intracelular. O receptor EP₃ é acoplado à proteína G_i e diminui a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

Existem duas isoformas da COX, a isoforma constitutiva (COX-1) e uma isoforma induzível da COX-2. A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e sintetiza as PGs em níveis baixos e, portanto, presume-se que sua função esteja relacionada principalmente com manutenção das funções fisiológicas (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; RAJAKARIAR et al., 2006).

Por outro lado, a COX-2 é altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, citocinas e mitógenos, e sua função tem sido associada à liberação de PGs inflamatórias (RAJAKARIAR et al., 2006). No SNC, além dos estímulos inflamatórios, essa enzima também pode ser induzida por glutamato em células gliais e neurônios (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003). Embora seja normalmente induzida por estímulos pró-inflamatórios, tem sido reportada a expressão de COX-2 constitutiva em alguns tecidos, incluindo cérebro, rins, pulmão, endotélio vascular e órgão do sistema reprodutor (RAJAKARIAR et al., 2006).

O aumento resultante na atividade da COX-2 pode contribuir para a neurodegeneração ou para o estresse oxidativo, ou para as ações neurotóxicas de PGs. A expressão aumentada de COX-2 está associada com uma série de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo convulsões, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003). Embora a indução da COX-2 por estímulos inflamatórios seja o principal responsável pelos altos níveis prostanoídes no local da inflamação, o papel da COX-1 em modular a resposta inflamatória não deve ser menosprezada (BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

Os prostanoídes são uma família de autacóides que desempenham múltiplas funções biológicas. A quantidade e variedade de prostanoídes produzidos durante a inflamação, que pode contribuir para a sensibilização periférica, são determinadas pela natureza e pelo estado

de ativação das células presentes na lesão inflamatória. Nas áreas de inflamação aguda, PGE_2 e a PGI_2 são produzidas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, enquanto os mastócitos liberam PGD_2 . Na presença de inflamação crônica, as células da série monócito/macrófago também liberam PGE_2 e TXA_2 (BURIAN; GEISSLINGER, 2005; HÉTU; RIENDEAU, 2005).

As PGs, principalmente PGE_2 e PGI_2 , são importantes mediadores da dor, febre e inflamação (KIDD; URBAN, 2001). A PGE_2 , a PGI_2 e a PGD_2 são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como histamina e bradicinina. Essa ação dilatadora combinada sobre as arteríolas pré-capilares contribui para o eritema e aumento do fluxo sanguíneo observado nas áreas de inflamação aguda. Esses prostanoides não aumentam diretamente a permeabilidade das vênulas pós-capilares, no entanto potencializam o efeito da histamina e da bradicinina. O TXA_2 , predominante das plaquetas, causa vasoconstrição, broncoconstrição e agregação plaquetária, sendo esta última seu principal efeito (BALLOU et al., 2000).

PGE_2 e outras PGs são potentes agentes de sensibilização capazes de modular a via de transdução (efeito estimulante periférico), transmissão (efeito estimulante central) e da informação nociceptiva. O principal mecanismo envolvido na ação de hiperalgesia periférica das PGs é devido ao efeito de sensibilização sobre os nervos aferentes primários. Os efeitos diretos são mediados pela ação das PGs sobre os receptores EP / IP e modulação de canais iônicos em aferentes primários. Os efeitos indiretos são dirigidos no sentido de aumentar a sensibilidade dos neurônios sensoriais aos agentes nocivos, tais como calor e bradicinina, além de contribuir significativamente para a sensibilização periférica mediada por PG (BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

As propriedades de hiperalgesia central de prostanoides foram estabelecidos principalmente em estudos experimentais com administração intratecal de PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TxB_2 , que evocam a hiperalgesia térmica e mecânica e imitam a sensibilização central associada com a inflamação periférica (BURIAN; GEISSLINGER, 2005).

Há também outra isoforma de COX, uma variante da COX-1, sendo frequentemente denominada como COX-3, estando expressa principalmente no cérebro e está envolvida nos fenômenos de febre e dor na resposta inflamatória (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; CARNEIRO et al., 2004; HÉTU; RIENDEAU, 2005; SANTOS et al., 2007). A **Figura 2** demonstra as isoformas da COX, bem como esquematiza a relação da ação dessas enzimas com processos fisiológicos e fisiopatológicos.

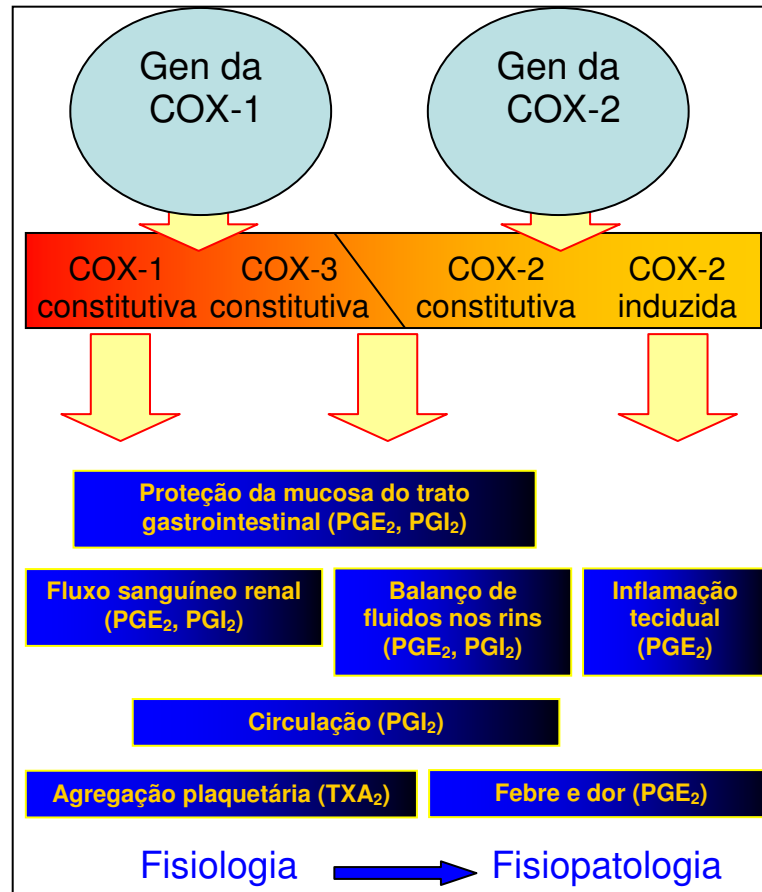


Figura 2. Genes que codificam COX-1 e COX-2 originam enzimas COXs constitutivas e induzidas envolvidas na homeostasia normal e em processos fisiopatológicos. Adaptado de WARNER; MITCHELL, 2002.

LTs são mediadores lipídicos bioativos produzidos e liberados por leucócitos ativados, mediando seus efeitos via receptores específicos acoplados à proteína G (WERZ; STEINHILBER, 2006). Na **Figura 3** está esquematizado o metabolismo do ácido araquidônico para formação de LTs.

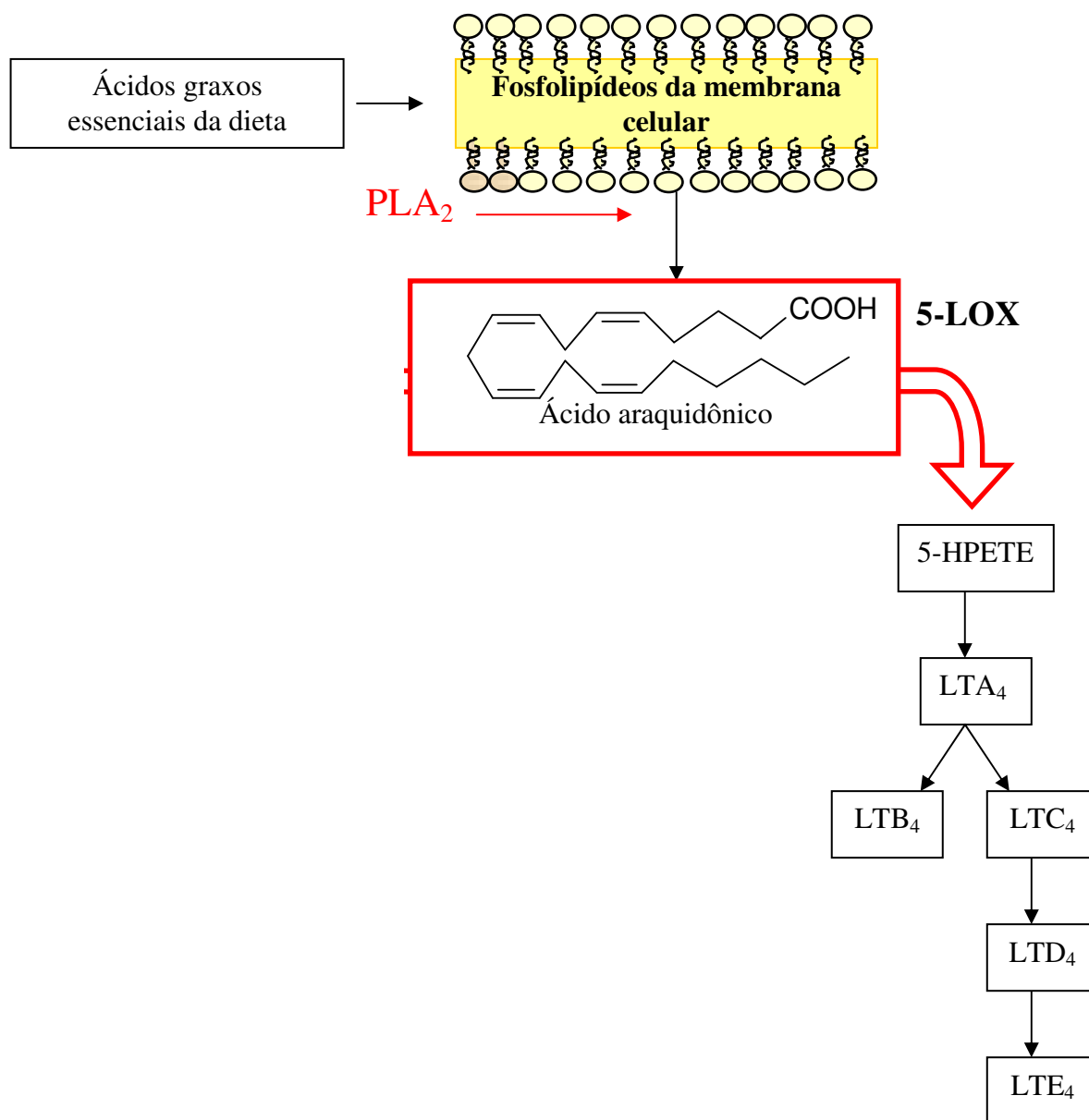


Figura 3. Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico e posterior formação de leucotrienos. Adaptado de BINGHAM *et. al.*, 2006; WERZ; STEINHILBER, 2006.

A síntese dos LTs começa com a ação de várias LOXs, que catalisam a incorporação de O₂ ao ácido araquidônico. Essas enzimas são encontradas nos leucócitos, coração, cérebro, pulmão e baço (SILVA *et al.*, 2002). 5-LOX catalisa a conversão de ácido araquidônico em LTA₄ e ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE). LTA₄ pode então ser convertido em LTB₄ por LTA₄ hidrolase ou em LTC₄ por LTC₄-sintase (WERZ; STEINHILBER, 2006).

LTB₄ é um potente quimiotático para neutrófilos, eosinófilos e monócitos levando a aderência dos fagócitos às paredes dos vasos, degranulação de neutrófilos e liberação de superóxido (O₂•⁻). LTC₄ e do seu metabolito, LTD₄, são broncoconstritores potente que o

aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a secreção de muco das vias aéreas. Essas propriedades biológicas sugerem um papel dos produtos da LOX tanto na inflamação quanto na broncoconstrição induzida por antígeno (SILVA et al., 2002; WERZ; STEINHILBER, 2006).

3.3.4 Óxido nítrico

Nos últimos 25 anos, a função do NO na biologia evoluiu do seu reconhecimento como poluente ambiental para substância endógena envolvida em comunicação intracelular e intercelular e na transdução de sinais. O NO é reconhecido no organismo humano por suas variadas funções fisiológicas, que abrangem os sistemas cardiovascular, imune, reprodutivo e nervoso, bem como pelo seu papel na hemostasia, configurando a esse mediador gasoso um primordial valor para o funcionamento normal do organismo (VANNI et al., 2007).

O NO é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima sintase do óxido nítrico constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS). As sintases do óxido nítrico (NOS) estão presentes no citosol, e são inibidas por análogos de L-arginina e requerem **nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato** reduzida (NADPH), tetraidrobiopterina (BH_4), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e heme como co-fatores (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; DUSSE et al., 2003). A **Figura 4** expõe a reação que é catalisada pela NOS.

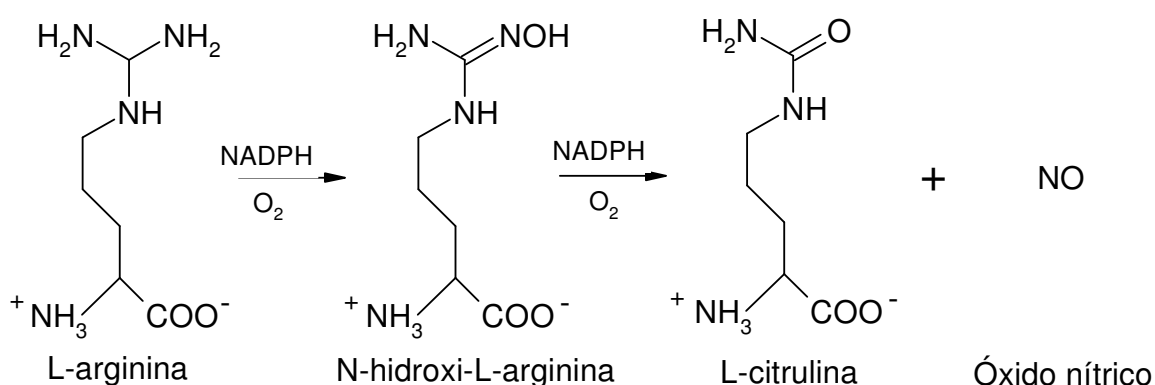


Figura 4. Reação catalisada pela NOS. Adaptado de DUSSE et al., 2003.

A cNOS e a iNOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO e já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os gens clonados. A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (nNOS, tipo I), presente

normalmente nos neurônios, e a NOS endotelial (eNOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (DUSSE et al., 2003).

A cNOS produz pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomoles, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de cálcio (Ca^{2+}). A isoforma iNOS é uma NOS induzida por citocinas pró-inflamatórias e lipopolissacarídeos, no endotélio e musculatura lisa vascular. Esta isoforma não é regulada por cálcio e produz grande quantidade de NO, que tem efeito citostático por inibição de enzimas contendo ferro, também causando fragmentação de DNA (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; DUSSE et al., 2003).

A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa devido a uma infecção ou dano tecidual. A expressão da iNOS resulta em inibição do crescimento de patógenos microbianos também e protege tecidos de danos em resposta inflamatória aguda sistêmica. A expressão de iNOS em endotoxemia é citoprotetora, inibindo microtrombose pela prevenção de adesão plaquetária e danos mediados por radicais livres (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

A iNOS é capaz de produzir NO por longo tempo e em quantidades significativas por macrófagos e outras células do sistema imune durante a resposta inflamatória, caracterizando seu envolvimento em vários processos patológicos (BARRETO et al., 2005). O NO interfere na atuação dos leucócitos na inflamação e promove a modulação da expressão de P-selectina (proteína de adesão) produzida no endotélio, reduzindo, dessa maneira, a adesão de leucócitos à parede vascular, bem como promove a diminuição da agregação de neutrófilos e de sua secreção. A reatividade de mastócitos é regulada por seu próprio NO e/ou de outra célula. O NO produzido pelos mastócitos modula a liberação de mediadores inflamatórios pelos mesmos, incluindo a histamina, PAF e o TNF, e também promove a diminuição da propensão de degranulação dos mastócitos. Nos macrófagos, o NO inibe a produção de uma variedade de citocinas imunomoduladoras, bem como modula a ação dessas mesmas sobre as células-alvo (VANNI et al., 2007).

Altos níveis de NO produzidos por macrófagos, por neutrófilos ou outras células ativadas, são tóxicos para micróbios, parasitas ou células tumorais, e podem também lesar células saudáveis vizinhas, estando este mecanismo presente na maioria de processos inflamatórios e auto-imunes (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

3.3.5 Citocinas e quimiocinas

Desde a primeira descoberta de citocinas, os interferon (IFNs), um considerável número de citocinas e suas funções têm sido descritas. É bem aceito que as citocinas constituem um elo entre as lesões celulares, ou o reconhecimento imunológico, e os sinais locais ou sistêmicos de inflamação. Além disso, a maioria das citocinas apresenta várias outras funções biológicas, incluindo a diferenciação celular, a sobrevivência, crescimento e metabolismo (VERRI-JÚNIOR, 2006).

Citocinas são um grupo heterogêneo de moléculas pequenas que atua de forma autócrina e parácrina. Abrangem diversas subfamílias, que incluem as ILs, IFNs, TNFs, fatores estimulantes de crescimento de colônias e quimiocinas. Em geral, elas são liberadas em uma sequência controlada a partir de vários tipos de células e são responsáveis pela produção final dos mediadores envolvidos na indução de sinais e sintomas inflamatórios. Esses polipeptídeos são transitoriamente produzidos e, geralmente, apresentam uma meia-vida curta. Estruturalmente, as citocinas têm baixo peso molecular (entre 5 kD e 140 kD). Alguns delas são glicoproteínas, geralmente sintetizado como moléculas de grande tamanho, que são precursores clivados para produzir a forma ativa (FELDMANN et al., 1996; BARSANTE et al., 2005; VERRI-JÚNIOR, 2006).

Algumas dessas substâncias, tais como IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e o TNF- α exercem atividade pró-inflamatória, sendo essencial para iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória. Essas citocinas pró-inflamatórias são definidas como polipeptídeos produzidos e liberados pelas células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios tais como vírus, parasitas, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas. Tais mediadores pró-inflamatório induzem a expressão de moléculas de adesão e quimioatraentes, facilitando o influxo e ativação de leucócitos (VERRI-JÚNIOR, 2006; BARSANTE et al., 2005).

As citocinas mediam o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório por sua atividade quimiotática (quimiocinas) e pela ativação de moléculas de aderência em leucócitos circulantes e células endoteliais em vasos adjacentes. Várias citocinas, incluindo IL-1 β , IL-8, TNF- α e IFN- γ são conhecido por serem importantes para o acúmulo de leucócitos nos locais de inflamação. As citocinas podem também aumentar a atividade bactericida dos fagócitos (RIOLLET et al., 2000).

As quimiocinas são um grupo grande de moléculas de citocinas que desempenham um papel importante no recrutamento de leucócitos na inflamação e na regulação da resposta

imune do tipo Th1 e Th2. As quimiocinas são induzidas por citocinas (TNF- α e IL-1 β), espécies reativas de oxigênio, pela ativação de NF- κ B, e pela via de sinalização dos receptores Toll (AKCAY et al., 2009).

Embora as quimiocinas sejam consideradas citocinas (citocinas quimiotáticas), pertencem a um grupo específico de citocinas com propriedades químicas e funcionais específicas. Elas são geralmente menores que outras citocinas (8-10 kDa) e agem em receptores acoplados à proteína-G (VERRI-JÚNIOR, 2006).

3.4 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios

3.4.1 Analgésicos opioides

Os opioides são os fármacos mais poderosos utilizados para dor aguda e crônica, embora os seus vários efeitos colaterais graves, como depressão respiratória, confusão mental, constipação, tolerância e dependência de capacidade produtiva, bem como a grande variabilidade nas respostas, limitem o seu uso seguro todos os dias (FÜRST, 2008).

Opiáceos são substâncias derivadas do ópio e incluem a morfina, a codeína e vários outros semi-sintéticos derivados destas últimas e da tebaína. O termo opioide é mais abrangente e se aplica a todos os agonistas e antagonistas com atividade semelhante à da morfina, incluindo peptídeos opioides naturais e sintéticos (SARAIVA et al., 2004).

Os analgésicos opioides inibem as vias nociceptivas através da ligação com receptores opioides no sistema nervoso, onde modulam a atividade sensitiva, motora e psíquica (BARROS, 2004; JAN, 2010). Os receptores opioides pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G_i. Eles são ativados tanto por peptídeos opioides produzidos endogenamente como fármacos opioides administrados exogenamente, a exemplo da morfina. Há pelo menos quatro subtipos de receptores opioides (μ , δ , κ e ν) e cada um deles apresentam seus ligantes (WALDHOER et al., 2004).

Os analgésicos exógenos apresentam em comum certas características, as quais são: um grupo amino terciário separado de um anel aromático por dois átomos, um átomo de carbono quaternário; e um anel fenílico ou isótero ligado ao átomo de carbono. O grupo farmacofórico N-metil-N-fenilpiperidina é a estrutura responsável pela ação farmacológica desta família de substâncias (FERREIRA; FACCIONE, 2005).

Os opioides são classificados como puros, como por exemplo a morfina e a metadona, ou agonistas parciais, como é caso da buprenorfina e nalbufina. A morfina, um agonista μ , é a referência entre os opioides, sendo um agente padrão para o tratamento das dores agudas e crônicas (RIBEIRO et al., 2002; CARVALHO-JÚNIOR, 2006). Os opioides mais utilizados na prática clínica são os agonistas opioides, como codeína, morfina, metadona, fentanil e oxicodona (LOBO et al., 2007). Conforme sua potência analgésica, são utilizados para o tratamento da dor discreta ou moderada (opióides fracos) ou da dor moderada ou intensa (opióides fortes) (BARROS, 2004).

3.4.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais

Os AINEs destacam-se entre os grupos farmacêuticos mais utilizados na prática médica devido a sua eficácia em suprimir dor e inflamação. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares. Além disso, muitas publicações científicas sugerem que poderiam ser eficazes na prevenção de doenças neurológicas, como Alzheimer, além de constituir-se uma opção terapêutica para casos de câncer (KUMMER; COELHO, 2002; BRUM-JÚNIOR, 2006; ONG et al., 2007).

Os AINEs incluem uma diversidade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas, no entanto muitos desses fármacos possuem três principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético. O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição do sistema enzimático denominado COX, responsável pela síntese dos diferentes tipos de eicosanoides (PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 , TXA_2), que são mediadores do processo inflamatório (BRUM-JÚNIOR, 2006).

O ácido acetilsalicílico, ou aspirina, foi sintetizado por Hoffmann em 1898. Inicialmente, este simples composto químico foi usado como um agente antipirético e anti-inflamatório. Na década de 60 a aspirina emergiu como um potente agente que prolongava o tempo de sangramento e inibia a agregação plaquetária. A aspirina reduz a ativação plaquetária por meio da acetilação irreversível da COX-1, e, portanto, reduz a produção de TXA_2 pelas plaquetas. A inibição da COX-1 é rápida, saturável em baixas doses, irreversível e permanente por toda a vida da plaqueta (TURNBULL et al., 2006; UNDAS et al., 2007).

Desde a descoberta do ácido acetilsalicílico, foram desenvolvidos vários AINEs, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes. Os AINEs são classificados como tradicionais, os quais inibem não seletivamente ambas as

isoenzimas COX-1 e COX-2, e inibidores seletivos de COX-2 (BRUM-JÚNIOR, 2006; ONG et al., 2007).

Embora os AINEs tradicionais sejam bastante efetivos no tratamento da dor e inflamação, o uso crônico de tais medicamentos está associado a lesões do trato gastrointestinal, anormalidade da coagulação e lesão renal (CARVALHO-JÚNIOR, 2006; ONG et al., 2007). Com isso, os inibidores seletivos para COX-2 foram desenvolvidos para amenizar as complicações gastrointestinais dos AINEs tradicionais. A descoberta de inibidores da isoforma COX-2 levou a obtenção da segunda geração de AINEs, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe, entre outros. Entretanto, o rofecoxibe foi retirado do mercado em 2004 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).

Há ainda os analgésicos da classe da acetanilidas, cujo representante principal é o paracetamol, que apesar de serem classificados como AINEs, não reduzem inflamação, apresentando apenas efeitos analgésicos e antipiréticos. O mecanismo de ação do paracetamol está correlacionado com a inibição da COX-3 (AYOUB et al., 2004).

3.4.3 Anti-inflamatórios esteroidais

Os glicocorticoides são hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória. A sua síntese e liberação ocorrem naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A estrutura química desses compostos possui o núcleo básico ciclopentanoperidrofenantreno. Os glicocorticoides sintéticos, desenvolvidos pela indústria farmacêutica, são muito semelhantes aos naturais, caso considerada a sua estrutura química (DAMIANI et al., 2001; BAVARESCO *et. al.*, 2005).

Os corticosteroides constituem a terapia anti-inflamatória mais eficaz para muitas doenças inflamatórias crônicas, como asma. Os corticoides têm sido considerados como agentes inibidores da produção de PGs, pela ação inibitória que exercem sobre a fosfolipase A₂, por meio da liberação de lipocortina-1, que é um mediador proteico anti-inflamatório. O resultado final da ação destes anti-inflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos mediadores pró-inflamatórios. A lipocortina-1 atua sequestrando o substrato fosfolipídico, além de inibir diretamente a fosfolipase A₂. Os glicocorticoides exógenos inibem também a

expressão da COX-2, reduzindo a geração de prostanoídes nas células inflamatórias, porém exercem pouco ou nenhum efeito sobre a enzima constitutiva COX-1 (BARNES, 2006; ONG et al., 2007).

3.5 Uso de plantas na medicina popular

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Entretanto, é o Reino Vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (MONTANARI; BOLZANI, 2001). O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (VARANDA, 2006). A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL et al., 2002).

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006). A cultura chinesa tem-se utilizado do conhecimento popular de ervas medicinais durante os últimos cinco séculos. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung, que é reconhecidamente o fundador da medicina chinesa (FOGLIO et al., 2006;

TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). A medicina tradicional chinesa se desenvolveu com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006).

No ano 78 d.C., o botânico grego Pedânios Dioscórides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais no tratado *De Materia Medica*. Este tratado permaneceu como fonte de referência por mais de quatorze séculos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (FOGLIO et al., 2006). No entanto, nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos de plantas passassem novamente a ocupar papel de destaque por grandes contingentes das populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento. A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, camptotecina e taxol, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

O entusiasmo em relação ao estudo de plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (VARANDA, 2006). Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semi-síntese, oriundos de nada mais do que 90 espécies, na utilização na terapia moderna (FOGLIO et al., 2006).

Em Cuba, a rica flora permite vasta tradição no uso de fitoterápicos. Já na África do Sul, o uso comum e medicinal de plantas é vasto, com grande produção e obtenção de extratos, o que movimenta setores da economia. No Brasil, existe uma flora bastante diversificada em toda a sua extensão, com vegetações de diferentes características e cujos princípios ativos são desconhecidos (VARANDA, 2006).

Um exemplo recente de um medicamento produzido a partir de plantas medicinais é o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Produto oriundo de pesquisa 100% nacional é encontrado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-

baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno α -humuleno. Outras substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides (COUTINHO et al., 2009).

As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcaloides da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

3.6 Considerações sobre a família Fabaceae

Fabaceae é uma grande família com 750 gêneros e mais de 18.000 espécies no mundo (WINK, 2003), com exceção do Ártico e da Antártica. Está difundida pelas regiões tropicais e subtropicais do planeta e em zonas áridas ou semi-áridas. Em número de espécies, é uma das maiores em dicotiledôneas e é a terceira maior família das angiospermas, ocorrendo em um grande número de habitats (HEYWOOD, 1996). No Brasil está representada por aproximadamente 188 gêneros e 2.100 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetais (LEWIS et al., 2005). No entanto, as espécies que compõe esta família se diferenciam entre as áreas, não só quanto à ocorrência, mas, sobretudo, quanto à abundância (TUCKER, 2003).

Esta é a terceira maior família de plantas com floração, embora seja a maior em termos de diversidade das formas e número de habitats. As leguminosas são bastante conhecidas por sua importância agrícola e econômica, representada por sua diversidade de espécies que são usadas para adubação, ornamentação, alimentação, madeira e combustível (LEWIS et al., 2005). Ecologicamente, esta família é importante em uma diversidade de ecossistemas. Algumas de suas subfamílias estão presentes e muitas vezes dominante, em quase todo tipo de vegetação da terra, de florestas tropicais a desertos (WOJCIECHOWSKI, 2003).

Representam uma parcela importante na composição da flora dos inselbergues (do

alemão: *insel* = ilha; *berg*= montanha), ambientes que constituem ecossistemas rochosos, geralmente graníticos ou gnáissicos, de ocorrência isolada ou agrupada, ricos em endemismos e abundantes no nordeste do Brasil (ALMEIDA et al., 2007).

A família Fabaceae é de grande relevância para a caracterização fisionômica dos diversos ambientes no domínio das caatingas. Estudos recentes enfatizam a distinção de sua flora em diferentes tipos de sedimento, abrindo caminho para uma nova visão em termos de florística e estimulando estudos de análise de similaridade. Na caatinga nordestina, estão catalogados até o momento 77 gêneros e cerca de 300 espécies desta família, representando aproximadamente um terço da vegetação e diversos representantes possuem grande potencial econômico como recurso forrageiro durante a seca, por ser o principal componente da diversidade vegetal do ambiente (CÓDULA et al., 2008).

A família Fabaceae, de acordo com tratamentos filogenéticos, foi subdividida em subfamília Caesalpinioideae, que é parafilética, além das duas subfamílias monofiléticas (Faboideae e Mimosoideae). Estas plantas são de grande importância econômica, sendo excelentes fornecedoras de alimentos proteicos, óleos, matéria-prima para indústria madeireira (ALMEIDA et al., 2007).

A subfamília Caesalpinioideae, bastante típica na flora amazônica e pobremente representada no Nordeste brasileiro, compreende 170 gêneros e cerca de 3.000 espécies. A Faboideae é a maior das três subfamílias, com 455 gêneros e cerca de 12.000 espécies. Alguns gêneros são característicos da flora amazônica e outros do Nordeste brasileiro. Mimosoideae é bastante rica em espécies no Nordeste brasileiro, compreendendo 65 gêneros e cerca de 3.000 espécies (TUCKER, 2003), nas quais destacamos a espécie *Piptadenia stipulacea* como objetivo deste trabalho.

3.6.1 Subfamília Mimosoidea e gênero *Piptadenia*

A subfamília Mimosoideae à qual pertence à espécie *Piptadenia stipulaceae*, é a menor das subfamílias das leguminosas, compreendendo 65 gêneros e abrangendo aproximadamente 3.000 espécies (TUCKER, 2003), distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e cálida-temperadas do globo (SOUZA; LORENZI, 2008). Esta subfamília caracteriza-se botanicamente como árvores, arbustos (principalmente) e ervas (raramente), resinosas ou não resinosas. Suas folhas são verdes o ano todo, suas flores são pequenas, bissexuais ou raramente unissexuais e seu fruto é usualmente um legume. Numerosas espécies são importantes economicamente, servindo como ornamentais, para obtenção de madeira,

forragem para ração animal, especialmente nas regiões áridas e nos países em desenvolvimento (NEILSON, 1992).

A subfamília Mimosoideae possui grande importância na fixação de nitrogênio por microrganismos, por apresentar maior incidência de gêneros com capacidade para associação simbiótica facultativa com bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, denominadas genericamente rizóbio, fornecendo assim subsídios para a fixação do N₂ atmosférico (KLEIN, 2000). Logo, esse alto potencial de nodulação com o nitrogênio, justifica a grande diversidade de alcaloides já isolados nesta família (LIRA, 2009).

Entretanto é bastante reportado que a classe dos flavonoides, também se destaca como marcador taxonômico. Dentre estes são encontrados flavonóis, flavonóis glicosilados, flavonas, isoflavonas, chalconas, entre outros. Já na classe dos alcaloides encontram-se alcaloides derivados da fenilalanina, da tirosina e do triptofano, entre outros (HARBORNE, 1971). Além dos alcaloides e flavonoides, já foram relatados, vários outros tipos de metabólitos, tais como aminoácidos não proteicos, aminas, cumarinas, antraquinonas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, glicosídeos cianogênicos, entre outros (WINK, 2003).

No Brasil, destacam-se as espécies dos gêneros *Mimosa*, *Acacia*, *Calliandra*, *Inga*, *Pithecellobium*, *Prakia*, *Piptadenia* e *Stryphnodendron*, muitos deles de valor medicinal (BARROSO, 1991). Suas espécies, geralmente ocupam os primeiros lugares na maioria dos levantamentos florísticos, realizados em ecossistemas de caatinga, onde em muitas delas no fim da estação chuvosa, suas flores, na maioria bem alvas, se tornam características na paisagem (PEREIRA et al., 2001). No Cariri Paraibano, esta subfamília é representada por 14 espécies, pertencentes a sete gêneros: *Acácia*, *Adenanthera*, *Chloroleucon*, *Mimosa*, *Piptadenia*, *Parapiptadenia* e *Prosopis* (BARBOSA et al., 2007).

O gênero *Piptadenia* Benth inclui 80 espécies de árvores, de arbustos e trepadeiras, que ocorrem principalmente em regiões aladas da América tropical (LEWIS, 1987; LEWIS, 1990; CARDOZO, 2006). No Brasil, ocorrem nos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Piauí, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (CARDOZO, 2006). Todavia, várias espécies, incluindo: *Piptadenia peregrina*, *Piptadenia macrocarpa*, *Piptadenia rigida*, *Piptadenia vidiflora*, *Piptadenia paraguayensi* e *Piptadenia africana* estão distribuídas na África tropical, do Senegal a Angola e em todo o Congo. Apenas a última espécie é encontrada em Camarões (MBOUANGOUERE et al., 2007).

O gênero *Piptadenia* despertou o interesse dos cientistas por seu uso na preparação do rapé (pó usado para inalação). Isto foi evidenciado desde a chegada de Cristóvão Colombo ao

novo mundo, quando Ramón Pane descreveu a inalação de um rapé narcótico pelos nativos das Ilhas do Caribe, que parece ter sido preparado com espécies de *Piptadenia*. O mesmo era observado por muitas tribos indígenas da América do Sul, onde o pó obtido a partir de sementes de *Piptadenia peregrina*, chamada por eles de cohoba, paricá ou yopo, quando inalado na forma de rapé produziam êxtase e alucinações. Só em 1954, através do trabalho de Stromberg, foi relatado a presença do alcaloide indólico 5-hidroxi-N,N-dimetiltriptamina (bufotenina), o então responsável pelo efeito alucinógeno (HENKER; HUSTON, 1950).

Entretanto, um dos primeiros trabalhos fitoquímicos no gênero foi a determinação do conteúdo de taninos na espécie *Piptadenia cebil* (ZELADA; CONI, 1915), o que justifica até hoje as espécies do gênero *Piptadenia* serem utilizadas na indústria dos curtumes por possuírem a casca rica em taninos (CARDOZO, 2006). Do ponto de vista etnomedicinal, o extrato aquoso da espécie *Piptadenia africana* (Fabaceae) Bark Guinea é usado externamente para o tratamento da gonorreia (AKENDENGUE, 1992). Já as folhas de *Piptadenia macrocarpa* (Fabaceae) Leaf Brazil é reportado como tóxico ao gado (CANELLA et al., 1966).

Segundo levantamento bibliográfico feito no Chemical Abstracts, Biological Abstracts e no banco de dados NATural PROducts ALERT (NAPRALERT), a química deste gênero é composta por diferentes classes de substâncias. Estudos com diferentes espécies, como *Piptadenia colubrina* Benth, *Piptadenia communis*, *Piptadenia contorta*, *Piptadenia excelta*, *Piptadenia falcata*, *Piptadenia leptostachya*, *Piptadenia macrocarpa*, *Piptadenia moniliformis* e *Piptadenia peregrina* mostraram que os alcaloides são os compostos majoritários do gênero *Piptadenia*, devido à presença de diferentes tipos de alcaloides indólicos nestas espécies. Outros metabólitos secundários que merecem destaque por sua presença no gênero são os esteroides, encontrados nas espécies *Piptadenia gonoacantha* e *Piptadenia macrocarpa* e os flavonoides encontrados nas espécies *Piptadenia africana*, *Piptadenia cebil*, *Piptadenia gonoacantha*, *Piptadenia macrocarpa* e *Piptadenia rígida*. Os alcaloides, quando presentes na espécie, são encontrados predominantemente nas sementes. Os trabalhos mais recentes, certamente usando técnicas mais eficientes de análise, não têm detectado alcaloides nas outras partes de espécies desse gênero. Entretanto, tem sido registrado a ocorrência de constituintes de outras classes de metabólitos secundários.

3.6.2 Considerações botânicas sobre a espécie *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke e suas atividades biológicas

Piptadenia stipulacea é uma planta de hábito arbustivo, que ocorre principalmente na mata de altitude e na caatinga do nordeste brasileiro, ocorrendo do Piauí até a Bahia (VASCONCELOS et al., 1984; SALES et al., 1998; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; BARBOSA et al., 2007; SANTANA; SOUTO, 2006). Essa planta apresenta diversos nomes populares, tais como jurema-branca, jurema malícia-da-serra, calumbi, carcará e rasga-beiço (FABRICANTE; ANDRADE, 2007; ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002). *Piptadenia stipulaceae* apresenta-se com dois sinônimos, *Piptadenia communis* var. *stipulaceae* Benth e *Pityrocarpa stipulacea* (Benth) Brenan. A **Figura 5** mostra uma fotografia de *Piptadenia stipulacea*.



Figura 5. *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke. A. arbusto; B. madeira; C. galhos (MAIA, 2000).

Piptadenia stipulacea é uma árvore pequena com cerca de 2-4 m de altura, com casca castanho-claro, fortemente armada por acúleos vigorosos. Possui folhas alternas, compostas, com 10-16 pares de pinas opostas, cada pina com 2 a 5,5 cm de comprimento e com 25-40 pares de folíolos verde-claros, foscas, oblongos, com 3-8 mm de comprimento. As flores em espigas possuem de 4-8 cm de comprimento, de cor alva, na extremidade dos ramos onde se encontram até três espigas por axila de folha. Seu fruto é uma vagem de cor castanho-pálido, com 8-12 cm de comprimento, com superfície ondulada nas áreas onde ficam as sementes. Contém 2-12 sementes pequenas, ovais de cor marrom por vagem. A madeira é de cor clara. É uma planta caducifólia e sua floração ocorre na estação chuvosa, mas pode também ser encontrada na estação seca, seguida pela frutificação que se estende até a estação seca (BEZERRA, 2008).

Ela é uma planta pioneira que facilmente ocupa capoeiras e beiras de estrada, sendo tolerante a elevados níveis de perturbação da vegetação (PEREIRA et al., 2001) e é muito utilizada como alimento para ovinos, caprinos e bovinos, principalmente, na estação seca quando não há pastagens para sua alimentação (BEZERRA, 2008).

Esta planta medicinal é encontrada no nordeste brasileiro, onde é reportada por suas atividades anti-inflamatórias. Nas regiões de caatinga, a tintura e o decocto da casca do caule e folhas dessa leguminosa são utilizados externamente contra inflamações (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; ALBUQUERQUE, 2006). Seu uso também já foi indicado como cicatrizante (BEZERRA, 2008).

Em testes para avaliar o seu potencial biológico, as folhas de *Piptadenia stipulacea* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas da bactéria *Klebsiella pneumoniae* multiresistentes e o fungo *Candida albicans* (BEZERRA, 2008). Testes com extratos (parte não especificada) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Streptococcus faecium* e antifúngica contra *Neurospora crassa* (CHIAPPETA; DE MELLO, 1984).

Com relação a sua constituição química, foi relatado o isolamento do alcaloide indólico bufotenina (WILLAMAN; LI, 1970). No entanto, existem poucos estudos científicos sobre sua constituição química do seu metabolismo secundário, bem como os que comprovem as atividades biológicas dessa planta. Embora flavonoides não sejam tão raros dentro da Fabaceae, FGAL foi isolado pela primeira vez nesta família (LIRA, 2009).

3.7 Aspectos gerais dos flavonóides

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (COUTINHO et al., 2009). Mais de 4000 flavonoides foram isolados a partir de plantas. Eles desempenham um papel importante no metabolismo das plantas e são consideradas substâncias bioativas relativamente não-tóxicas (ODONTUYA et al., 2005).

Flavonoides são compostos fenólicos de origem natural de considerável interesse científico e terapêutico. O termo flavonoide é um nome coletivo dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo-g-pirona. Consistem de um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004). A **Figura 6** mostra o esqueleto estrutural básico dos flavonoides.

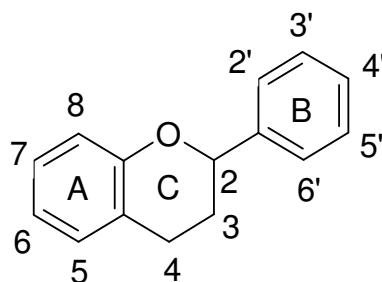


Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides. Adaptado de BEHLING et al., 2004.

Os flavonoides estão divididos em subclasses baseados nas conexões nos anéis B e C bem como no grau de saturação, oxidação e hidroxilação do anel C, conforme mostra a **Figura 7**. As características estruturais os dividem em chalconas, flavanolol, flavononas, flavonas, flavonois, isoflavonoides, flavan-3-óis e antocianidinas (BEHLING et al., 2004; WILLAIN-FILHO, 2005; OLIVEIRA, 2005b).

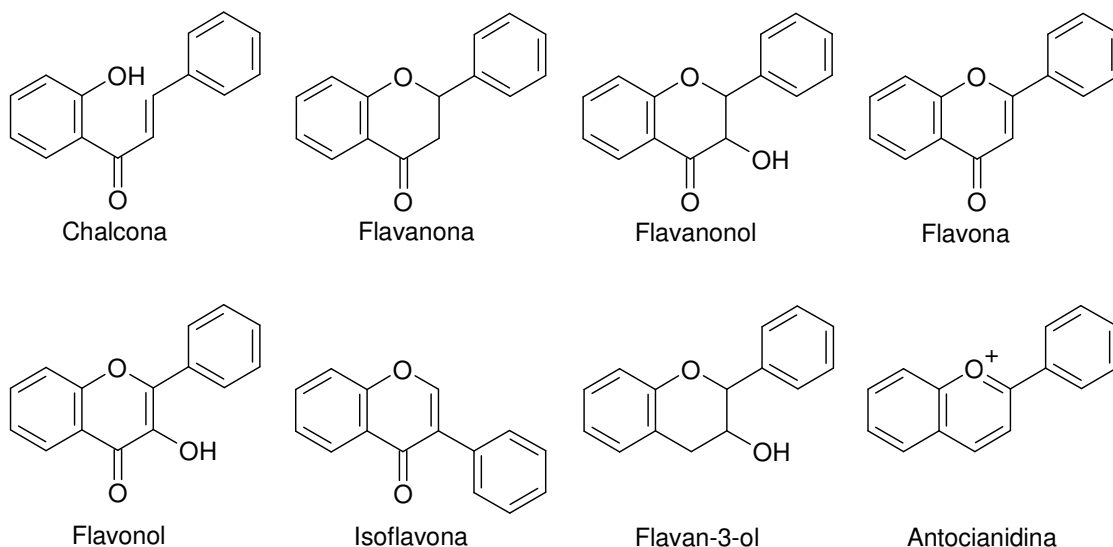


Figura 7. Classificação dos flavonoides. Adaptado de COUTINHO et al., 2009.

Esse grupo de substâncias são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, comumente encontrados em frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho (BEHLING et al., 2004; WILLAIN-FILHO, 2005). As flavononas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, conferindo-lhes o sabor característico. As flavonas distribuem-se em ervas e grãos, contribuindo para o sabor e coloração dos tecidos vegetais. As isoflavonas estão presentes em grãos, como a soja, onde possuem atividade estrogênica. As antocianinas são encontradas em frutos, produzindo coloração azul e vermelha; as catequinas também estão presentes em frutos (CAMARGO, 2007).

Muitos flavonoides ocorrem naturalmente como flavonoides glicosilados, ou seja, apresentam açúcares simples ou complexos como substituintes nos anéis centrais; dentre eles destacam-se: D-glucose, L-raminose, glucoramnose, galactose, ligninas, arabinose. No entanto, alguns flavonoides podem ser encontrados na forma de aglicona, sem açúcares ligados aos anéis centrais (PIMENTEL, 2006).

Dentre as várias atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides, destacam-se as suas propriedades diuréticas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antiulcerativas, antivirais, antifibrótica, estrogênicas, antioxidante e antineoplásica, dentre outras (BEHLING et al., 2004; WILLAIN-FILHO, 2005).

3.7.1 Considerações sobre a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos flavonoides

Em relação à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como PLA₂, COX e LOX, além de modularem iNOS (COUTINHO et al., 2009).

Muitos dos efeitos anti-inflamatórios e cardiovasculares, propostos por flavonoides e compostos fenólicos, interferem no metabolismo final do araquidonato, visto que são capazes de inibir os sistemas de enzimas, incluindo fosfolipase A₂, COX e 5-LOX (SILVA et al., 2002; CAMARGO, 2007). Em relação à atividade inibitória da enzima fosfolipase A₂, além de quercetina e kaempferol, destacam-se também miricetina e as flavanonas hesperetina e naringenina. Alguns flavonoides são conhecidos pela inibição da enzima LOX, tais como os flavonóis morina e miricetina, e outros pela inibição da enzima COX, tais como as flavonas crisina, apigenina, luteolina e os flavonóis morina, rutina e galangina. Outros, como quercetina e kaempferol apresentam significativa ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída à inibição de ambas as enzimas LOX e COX (COUTINHO et al., 2009).

Além de inibir diretamente a síntese de eicosanoides por meio da inibição da atividade das enzimas LOX e COX, os flavonoides inibem indiretamente estas enzimas pela inibição da peroxidação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados, que também atuam na ativação dessas oxigenases (SILVA et al., 2002). A **Figura 8** esquematiza o mecanismo pelo qual flavonoides com atividade antioxidante inibem indiretamente COX.

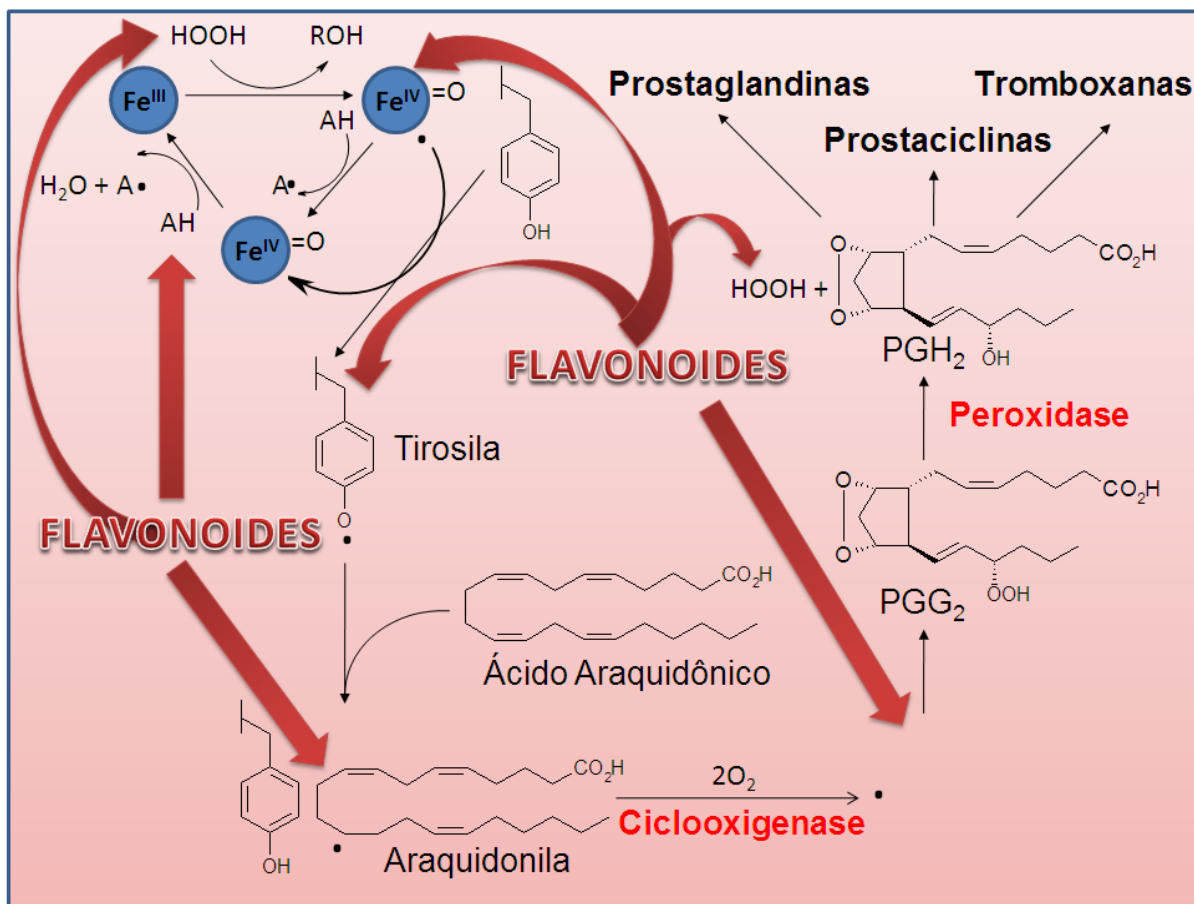


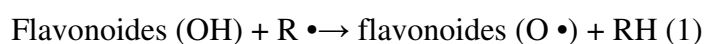
Figura 8. Flavonoides com atividade antioxidante inibem COX através do sequestro de radicais livres. Adaptado de SMITH et al., 2000; NIJVELDT, 2001; ROUZER; MARNETT, 2009.

Como se pode observar na **Figura 8**, durante a catálise do ácido araquidônico, é necessária a oxidação do grupo heme pelo sítio peroxidase, originando a formação de hidroperóxido, radical oxiferrila e, subsequente geração de radical tirosila no sítio ciclooxygenase da COX, que é responsável pela formação do radical araquidonila, o qual reage com o O_2 para a produção de PGG_2 . Posteriormente, PGG_2 é reduzida à PGH_2 no sítio peroxidase, com a produção de um intermediário de radicais livres que rapidamente se converte em um radical $\bullet\text{OH}$ (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; HÉTU; RIENDEAU, 2005; BINGHAM et al., 2006). Flavonoides podem atuar sequestrando radicais livres, inibindo assim de forma indireta a ação da COX. Além disso, flavonoides também são conhecidos por quelar o ferro, eliminando assim um fator causal para a produção de radicais livres (NIJVELDT, 2001).

A maior parte dos estudos envolvendo flavonoides se concentra em suas propriedades bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao potencial antioxidante na proteção dos sistemas biológicos durante estresse oxidativo. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da

propriedade redox de seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química (PIMENTEL, 2006).

Tem sido proposto que flavonoides interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide. O radical flavonoide, então, reage com o radical livre, terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (SILVA et al., 2002). Em outras palavras, os flavonoides estabilizam as ROS pela reação com o radical. Devido à alta reatividade do grupo hidroxila dos flavonoides, os radicais são inativados, de acordo com a seguinte equação (NIJVELDT, 2001):



onde R é um radical livre e O • é um radical livre de oxigênio

Além disso, os altos níveis de NO (produzidos pela ação de iNOS) reage com os radicais livres, produzindo o peroxinitrito, altamente prejudicial porque pode oxidar diretamente LDLs, resultando em dano irreversível à membrana celular. Quando flavonoides são utilizados como antioxidantes, os radicais livres são sequestrados e, portanto, não pode mais reagir com o NO resultando em menos danos (NIJVELDT, 2001).

O desequilíbrio na síntese de LTs e de PGs pode resultar em respostas inflamatórias como distúrbios respiratórios, doenças cardiovasculares e renais, respectivamente. Com isso, torna-se de grande importância o estudo do efeito farmacológico de compostos naturais, como flavonoides, com o objetivo de desenvolver novos fármacos para o tratamento dessas patologias, uma vez que várias pesquisas têm demonstrado que tais compostos apresentam atividade anti-inflamatória (SILVA et al., 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais e soluções utilizados

Tabela 1. Soluções e materiais utilizados nos ensaios farmacológicos

Nome	Marca
Ácido acético glacial, 100%, P.A.	Nitrogenius Produtos Químicos
Ácido gálico 97,5%	Sigma
Azul de tripan, 10%	Sigma
Cloreto de sódio	Sigma
Dipirona	Ao farmacêutico
DMSO 100%	Sigma
DPPH	Santa Cruz
Formaldeído 37%	Sigma
Goma arábica 0,05%	Ao farmacêutico
Indometacina	Ao farmacêutico
Kit de ELISA de avaliação da inibição de COX-1/COX-2 ovina	Cayman Chemicals
Metanol anidro 99,8%	Sigma-Aldrich
Morfina, 10 mg/mL	Cristália
Tween 20	Sigma
Zymosan A	Sigma

4.1.2 Equipamentos utilizados

Tabela 2. Equipamentos utilizados nos ensaios farmacológicos

Nome	Marca
Agitador de placa, modelo Thys 2	MLW
Agitador de tubo (Vortex)	Biomixer
Balança Analítica, AG 200	Gehaka
Banho-maria	Evlab
Chapa aquecedora	Biomixer
Contador Manual de Volume com Tecla 4 Dígitos	Milky Way
Deonizador de água Mili Q	Millipore
Espectrofotômetro Digital Faixa 325~1000nm, Modelo SP-22	Biospecto
Fluxo Laminar	VECO
Freezer	Brastemp
Geladeira	Brastemp
Leitora Automática de Microplacas de 8 Canais Mod. TP Reader NM	Termoplate
Microscópio óptico	Olympus
Pipetas automáticas	Gilson
Placa quente (Hot Plate)	Insight
Ultra Freezer de -50 a -86°C, vertical, Modelo IULT 335D SPECIAL	Indrel

4.1.3 Fases e substância obtidas de *Piptadenia stipulaceae*

As fases aquosa e acetato de etila das partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae*, bem como o flavonoide FGAL (**Figura 9**) foram cedidos pela Professora Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos da Universidade Federal da Paraíba (LIRA, 2009).

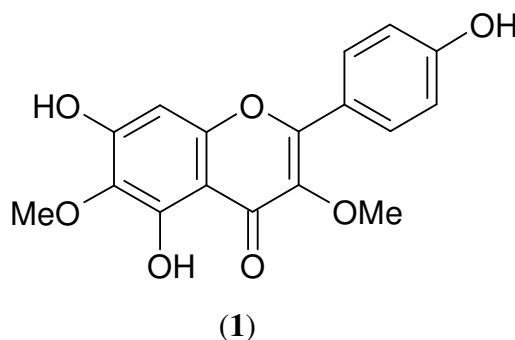


Figure 9. Estrutura química do flavonoide FGAL.

4.2 Metodologia

4.2.1 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 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas). Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas com normas estabelecidas pela Comissão de Ética Internacional para manuseio de animais em modelos de inflamação (ZIMMERMAN, 1983), bem como 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.

4.2.2 Fases e substâncias utilizadas

Foram utilizados fase aquosa (100 mg/kg), fase acetato de etila (100 mg/kg) e o flavonóide FGAL (100 μmol s/kg, que corresponde a 33 mg/kg) isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulaceae*, bem como fármacos padrões como a dipirona (100 μmol s/kg), indometacina na concentração de 100 μmol s/kg e morfina na dose de 15 μmol s/kg. A

administração das substâncias foi realizada 40 minutos antes do início do experimento. A via de administração das fases aquosas e acetato de etila foi a via oral, já a administração do flavonóide, dipirona e indometacina ocorreu pela via oral ou intraperitoneal. A morfina foi administrada por via sub-cutânea. Para execução do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o ácido acético 100% foi diluído a 0,1 N, antes do ensaio. A formila 2,5% foi preparada através de formaldeído 37% diluído em salina. A solução de zymosan A foi preparada na concentração de 2 mg/mL antes da realização do ensaio de peritonite induzida por Zymosan A. Para a realização do ensaio de avaliação da inibição de COX *in vitro*, FGAL e indometacina foram diluídas previamente em DMSO e posteriormente no tampão de reação do kit. Para avaliação da atividade sequestrante radicalar, FGAL e ácido gálico foram solubilizados em metanol, obtendo-se uma solução de 0,3 mM. Também foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL e a mesma foi misturada a solução de FGAL ou ácido gálico (0,3 mM) na proporção de 1:1 para execução do método fotocolimétrico de DPPH.

4.2.3 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O perfil da antinocicepção periférica foi avaliado através do ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os compostos foram administrados por via oral ou intraperitoneal, tendo como respectivos veículos a goma arábica 0,5% e tween:água (1:99, V/V). Quarenta minutos após o tratamento, foi realizada a administração de ácido acético 0,1N (0,1mL/10g de peso) na cavidade peritoneal dos animais. Dez minutos após a injeção, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Foram feitos também controles do ácido acético (controle positivo) (COOLIER et al., 1968).

4.2.4 Ensaio da çlaca quente (hotplate test)

A atividade antinociceptiva central foi avaliada através do teste da placa quente ($55 \pm 0,1$ °C), utilizando-se camundongos suíços de ambos os sexos com pesos entre 21 e 28 gramas e mantidos em jejum por um período de 8 horas. Os animais foram colocados sobre a placa aquecida e suas respostas ao estímulo térmico (retirada e lambida das patas traseiras ou dianteiras) foram cronometrados. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-off” (máximo de permanência do animal na placa) de 10 segundos. Posteriormente, a substância-teste foi administrada via oral ou

intraperitoneal, e a relação entre volume da suspensão e o peso do animal foi 0,1 mL/20 g. Após um intervalo de 30 minutos, novas medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos durante 2 horas (KURAISHI et al., 1983).

4.2.5 Teste de formalina

O ensaio consiste na injeção subcutânea de 20 µL de uma solução de formalina 2,5% (v/v) – formaldeído diluído em salina – na face dorsal da pata traseira do animal após 1 hora da administração oral da substância teste (ou veículo na obtenção de controle). O ensaio é caracterizado por duas fases distintas: uma fase de dor aguda (1ª fase) e outra de hiperalgesia (2ª fase), sendo a 1ª fase constituída por os 5 primeiros minutos após injeção subplantar e a 2ª fase o tempo entre 15 e 30 minutos após a injeção subplantar. O tempo que o camundongo permanece lambendo a pata durante estas duas fases foi registrado (HUNSKAAR; HOLE, 1987)

4.2.6 Ensaio de peritonite induzida por zymosan A

Os camundongos foram tratados ou não com as substâncias em análise, e após 30 minutos foram submetidos simultaneamente ao ensaio de peritonite, por administração intraperitoneal de 0,5 mL de uma solução de zymosan A (2 mg/mL). Após 6 hs da injeção de zymosan A, a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}). Em seguida realizou-se a análise do lavado peritoneal e contagem total do número de células. A contagem foi feita em microscópio ótico em objetiva de 100x. (LEITE et al., 2007).

4.2.7 Ensaio de avaliação de inibição de COX *in vitro*

O flavonoide FGAL foi avaliado ainda quanto à sua capacidade de inibir COX ovina de acordo com o método descrito por UDDIN e colaboradores (2004), utilizando para tanto o kit de determinação da inibição de COX-1/COX-2 ovina (Cayman Chemicals, MI, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.7.1 Biossíntese de prostaglandina

COX catalisa a primeira etapa da biossíntese do ácido araquidônico para PGH_2 . $\text{PGF}_{2\alpha}$ produzida a partir de PGH_2 por redução com cloreto de estanho, é medido por ensaio imunoenzimático. As soluções de compostos testes foram preparadas utilizando como solvente DMSO e tampão de reação (fornecido no kit). A **Figura 10** esquematiza essa etapa do ensaio. Resumidamente, uma série de soluções tampão de reação fornecida (0,1 M Tris-HCl Ph 8,0 contendo 5mM EDTA e 2mM fenol) foi aliquoteada em tubos eppendorf, onde eram adicionadas as enzimas COX-1 ou COX-2 (10 μL) na presença de heme (10 μL). Posteriormente, foram adicionados 10 μL de soluções de FGAL e indometacina (0,2 μM em um volume final de 100 μL). Estas soluções foram incubadas por um período de 5min a 37° C. Posteriormente, 10 μL de uma solução de ácido araquidônico (100 μM) foi adicionada e a reação de COX foi interrompida pela adição 50 μL de HCl (1M) após 2min do início da reação. $\text{PGF}_{2\alpha}$, produzido de PGH_2 por redução com cloreto de estanho foi medido por ensaio imunoenzimático.

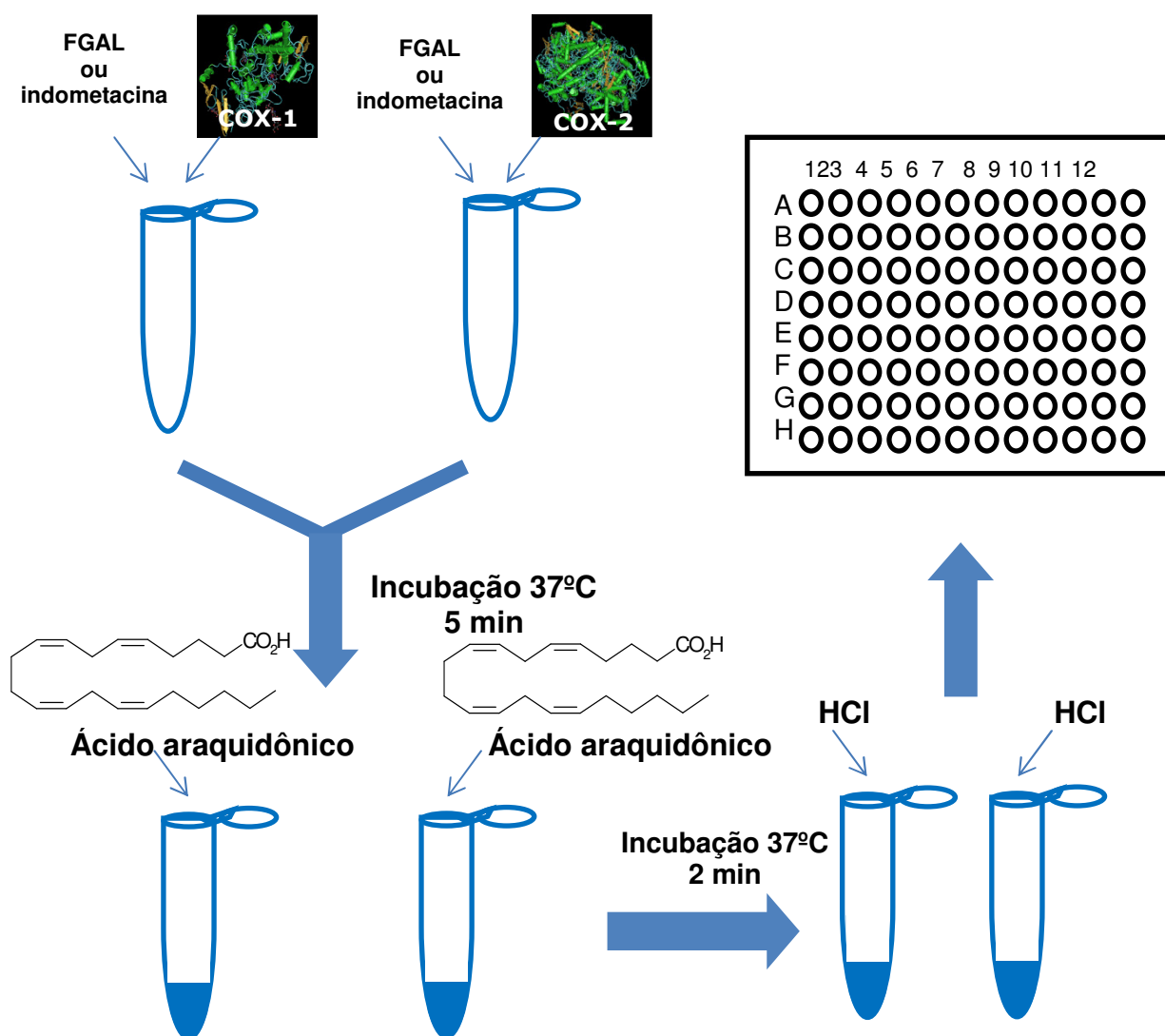


Figura 10. Esquematização da etapa de biossíntese de PG do ensaio de avaliação da atividade inibitória de COX.

4.2.7.2 Ensaio imunoenzimático

Como exposto na **Figura 11**, este teste baseia-se na concorrência entre PGs e o conjugado PG-acetilcolinesterase para uma quantidade limitada de anti-soro de PG. A quantidade PG capaz para ligar ao anti-soro PG é inversamente proporcional à inibição da COX, pois a concentração do conjugado PG-acetilcolinesterase é mantida constante, enquanto que a concentração de PGs varia. Este complexo PG-acetilcolinesterase se liga a um anticorpo monoclonal (anticorpo específico para PG) previamente colocado nos poços da placa. A placa é lavada para remover os reagentes e, em seguida é adicionado o reagente de Ellman, que contém o substrato da acetilcolinaesterase. O produto desta reação enzimática

produz uma cor distinta amarela, que absorve em 412 nm. A intensidade desta cor é determinada espectrofotometricamente, e é proporcional à quantidade de conjugado PG-acetilcolinesterase que se ligou ao anti-soro PG, que é inversamente proporcional à quantidade de PGs presentes no poço durante o período de incubação.

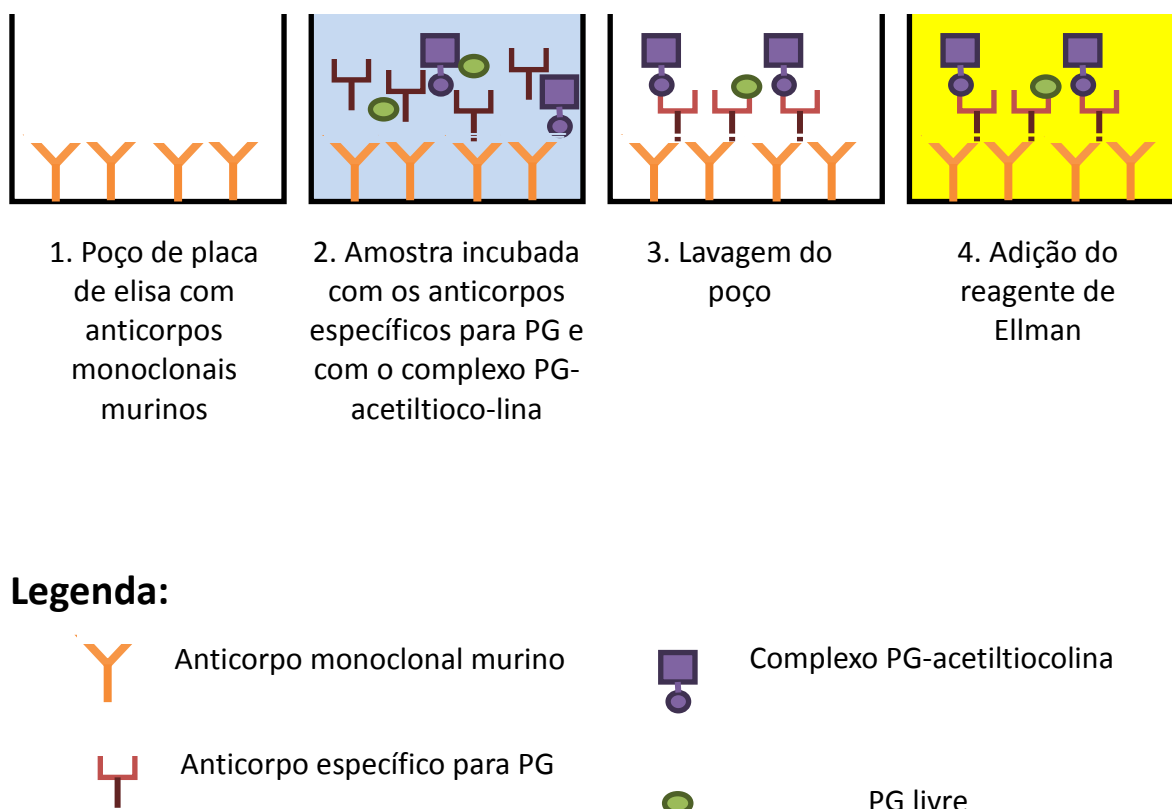


Figura 11. Esquematização da placa de imunoensaio utilizada para realização do ensaio de avaliação da inibição de COX.

4.2.8 Análise quantitativa da atividade sequestrante radicalar

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras de FGAL, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de 0,3 mM do flavonoide. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 516 nm. (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAMS, 1995).

4.2.8.1 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 $R = 0,9997$.

4.2.8.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras

Uma solução de FGAL a 3 mM foi preparada em metanol. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra de FGAL e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 µg/mL) foram feitas a 516 nm, no 1°, 5°, 10° e 15° min. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução de FGAL (0,3 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância nos tempos de leitura para solução de FGAL, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação:

$$\%DPPH_{REM} = [DPPH]T / [DPPH]T_0 \times 100$$

onde $[DPPH]T$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com a amostra e $[DPPH]T_0$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL (100 µmol/mL) (BRAND-WILLIAMS, 1995).

Os valores de absorvância no tempo de 15 min para amostra de FGAL (0,3mM) e ácido gálico (0,3 mM), 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).

4.2.9 Análise Estatística

Para os ensaios *in vivo*, os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett. Os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os níveis de significância entre os grupos experimentais do flavonoide por via oral e por via intraperitoneal no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético foram feitos utilizando o teste t Student, e os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$. No ensaio de avaliação da inibição de COX *in vitro*, os resultados foram considerados significantes quando $P < 0,05$ ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett, comparando-se os grupos experimentais com o grupo controle (sem inibidor, apenas veículo). Neste ensaio, realizou-se análise estatística utilizando o teste t de student, para obter os níveis de significância entre os resultados obtidos com indometacina para COX-1 versus COX-2, com FGAL para COX-1 versus COX-2, com indometacina ou FGAL para COX-1, e com indometacina ou FGAL para COX-2, e os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$. A análise estatística dos resultados obtidos no método fotolorimétrico de DPPH foi realizada utilizando o teste t de student e os valores foram considerados significantes quando $*p < 0,05$. Toda análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 3.1.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antinociceptiva de *Piptadenia stipulacea* no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Para dar início ao estudo das propriedades antinociceptivas das fases aquosa e acetato de etila, bem como do flavonoide isolado de *Piptadenia stipulacea*, utilizou-se o modelo de contorções induzidas por ácido acético, cujos resultados estão mostrados na **Figura 12**. Realizou-se primeiramente a avaliação farmacológica dos compostos pela via oral, por ser a via mais frequentemente utilizada para administração de medicamento em seres humanos, e também por não ser invasiva. A injeção intraperitoneal de ácido acético induziu $42,60 \pm 1,21$ contorções nos animais do grupo controle durante o período de 20 minutos de observação. De acordo com os resultados obtidos, a fase aquosa e a fase acetato de etila, nas referidas doses administradas, apresentaram-se efetivos em diminuir o número de contorções abdominais, uma vez que houve uma diferença estatisticamente significativa com $P < 0,05$, quando comparado com o grupo controle, apresentando uma porcentagem de inibição de $49,9\% \pm 11,2$ e $54,6\% \pm 5,3$. Quando FGAL foi administrado por via oral, observou-se uma baixa porcentagem de inibição das contorções abdominais ($39,0\% \pm 6,8$), por isso decidiu-se verificar também a atividade dessa substância por via intraperitoneal. Como esperado, FGAL apresentou maior atividade antinociceptiva ao ser administrado pela via intraperitoneal (porcentagem de inibição de $64,8\% \pm 8,1$) quando comparado com a via oral, o que sugere a inativação de tal substância através do metabolismo de primeira passagem ou limitação na absorção no trato gastrointestinal por labilidade em meio ácido. Portanto, escolheu-se a via intraperitoneal para dar sequência ao estudo com FGAL.

5.2 Atividade antinociceptivacebral da fase acetato de etila de *Piptadenia stipulacea* no ensaio da Placa Quente (HotPlate Test)

Para avaliar o perfil antinociceptivo central, a fase aquosa e acetato, bem como o flavonoide isolado de *Piptadenia stipulacea* foram submetidos ao ensaio de placa quente. Os resultados estão expressos na **Figura 13**. Neste modelo, apenas a fase acetato de etila apresentou aumento do tempo de latência nos tempos 120 min e 150 min, além da morfina (fármaco padrão utilizado no modelo). Assim como evidenciado nos resultados, com exceção

da fase acetato de etila, a fase aquosa e o flavonoide possivelmente não apresentam efeitos antinociceptivos centrais.

5.3 Atividade antinociceptiva de *Piptadenia stipulacea* no teste de formalina

Para avaliar melhor o perfil antinociceptivo as substâncias foram submetidas ao ensaio de nocicepção induzida por formalina, cujos resultados estão mostrados na **Figura 14**. Na 1ª fase do modelo apenas a fase acetato de etila exerceu efeito antinociceptivo, caracterizado pela diminuição significativa do tempo de lambida da pata quando comparado com o controle apenas com formalina, apresentando porcentagem de inibição de nocicepção de $40,2\% \pm 10,3$. A fase acetato de etila também se mostrou eficaz em diminuir a nocicepção na segunda fase do teste, com porcentagem de inibição de $59,9\% \pm 6,5$. A fase aquosa (administrado por via oral) e FGAL (administrado por via intraperitoneal) não apresentaram efeitos contra nocicepção na primeira fase do teste de formalina, apenas na fase inflamatória, com porcentagem de inibição da nocicepção de $72,6 \pm 5,5$ e $66,0\% \pm 8,0$, respectivamente. O fármaco padrão utilizado (indometacina) também apresentou atividade antinociceptivo significativa na fase neurogênica quando administrado por via intraperitoneal ($34,3\% \pm 3,5$), mas não por via oral ($25,3\% \pm 8,6$) devido à menor biodisponibilidade do fármaco por esta última via de administração. Com relação à segunda fase, a indometacina quando administrada tanto por via oral como por via intraperitoneal, diminuiu o tempo de lambida da pata na ordem de $50,0 \pm 12,5$ e $76,5\% \pm 3,1$, respectivamente.

5.4 Atividade anti-inflamatória de *Piptadenia stipulacea* no ensaio de peritonite induzida por zymosan A

Para confirmar a provável atividade anti-inflamatória evidenciada no teste de formalina das fases acetato de etila e aquosa e de FGAL, realizou-se ainda o ensaio de peritonite induzida por zymosan A. Os resultados do citado ensaio estão expostos na **Figura 15**. A fase aquosa, a fase acetato de etila e FGAL apresentaram efeito anti-inflamatório significativo quando comparadas ao grupo controle, apresentando porcentagem de inibição de recrutamento celular de $35,8 \pm 4,9$, $37,7 \pm 6,2$ e $31,3\% \pm 13,3$, respectivamente, evidenciando desta forma a atividade anti-inflamatória de *Piptadenia stipulacea*. Verificou-se também a atividade anti-inflamatória da indometacina, quando administrada por via oral e

intraperitoneal. Este fármaco de referência reduziu o recrutamento de leucócitos em $48,6 \pm 4,4$ e $56,7\% \pm 4,6$, respectivamente.

5.5 Inibição de COX *in vitro* através da ação de FGAL

A capacidade de FGAL para inibir COX-1 e COX-2 ovinas foi determinada utilizando um kit imunoenzimático, de acordo com a metodologia descrito por UDDIN e colaboradores (2004), cujos resultados estão na **Figura 16**. Observa-se que FGAL, na concentração de 0,2 μ M inibiu, significativamente, tanto COX-1 ($79,5\% \pm 0,6$) como COX-2 ($56,0\% \pm 3,8$), com um perfil de inibição similar ao observado para indometacina na mesma concentração ($93,0 \pm 2,6$ e $79,0\% \pm 1,5$, respectivamente). Desta forma, verificou-se que indometacina e FGAL inibiram COX-1em maior proporção do que COX-2. Além disso, indometacina inibiu de forma mais eficaz, tanto COX-1 como COX-2 quando comparado a FGAL.

5.6 Atividade sequestrante radicalar de FGAL no método fotolorimétrico do DPPH

Com relação ao comportamento cinético da reação do DPPH com FGAL, na concentração de 0,3 mM, observou-se que a amostra apresentou cinética rápida, atingindo $23,3\% \pm 0,2$ de consumo do DPPH no primeiro minuto, mostrando aumento significativo do consumo de DPPH ao longo do tempo total de observação (15 min). A atividade sequestrante de radicais, expressa em percentual de inibição (PI), exibida pelo flavonoide FGAL isolado de *Piptadenia stipulacea* e do ácido gálico, ambos na concentração de 0,3 mM, está expressa na **Figura 17**. Com base nestes dados, o composto isolado FGAL e controle positivo ácido gálico apresentaram porcentagem de inibição do DPPH de $92,7 \pm 0,1$ e $83,6\% \pm 3,7$, respectivamente.

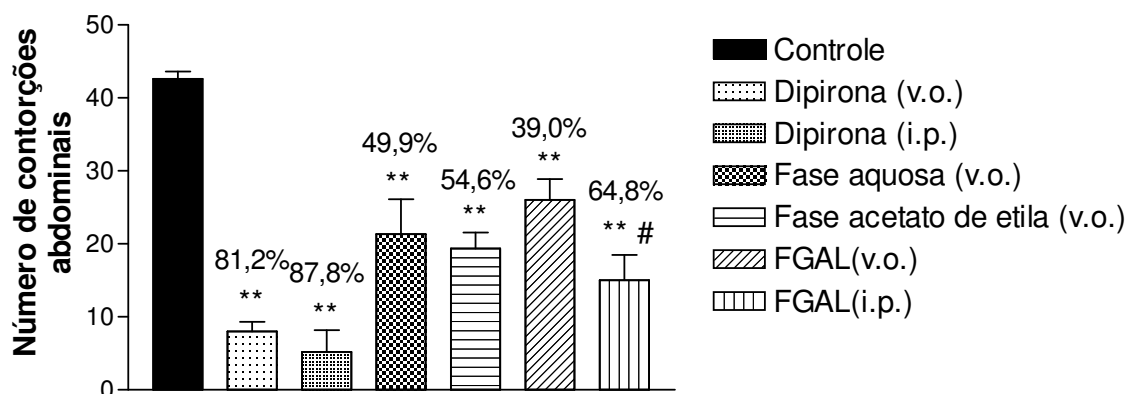


Figura 12. Efeito antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/kg, v.o.), FGAL (100µmol/kg, v.o. ou i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e dipirona (100µmol/kg, v.o. ou i.p.) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (**P<0,01 foi considerado significativo ao nível de 99% de confiança no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett; # P<0,05 quando a diferença entre os resultados obtidos com FGAL administrado por via oral e por via intraperitoneal foi considerada significativa ao nível de 95% de confiança no teste t student).

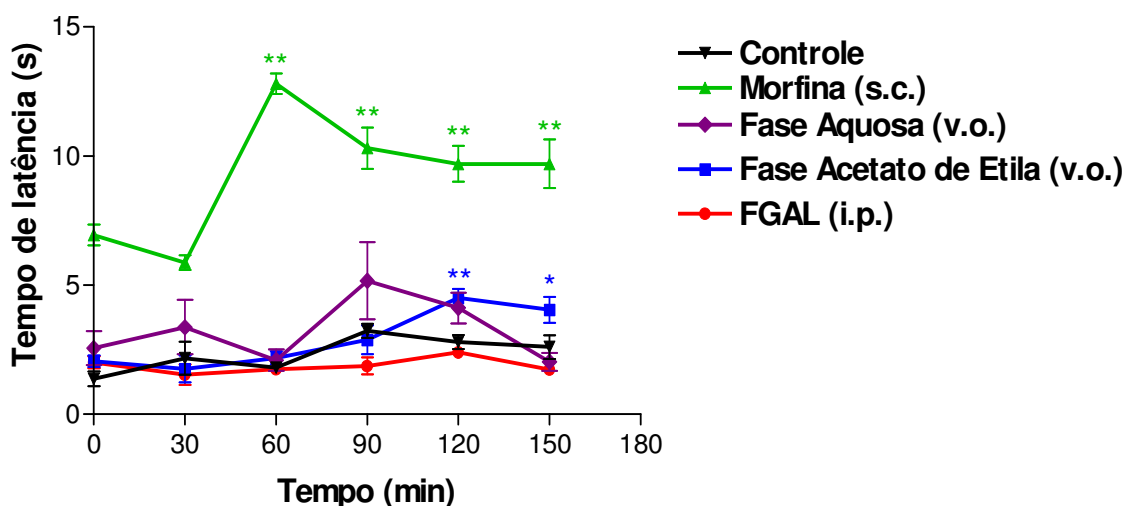
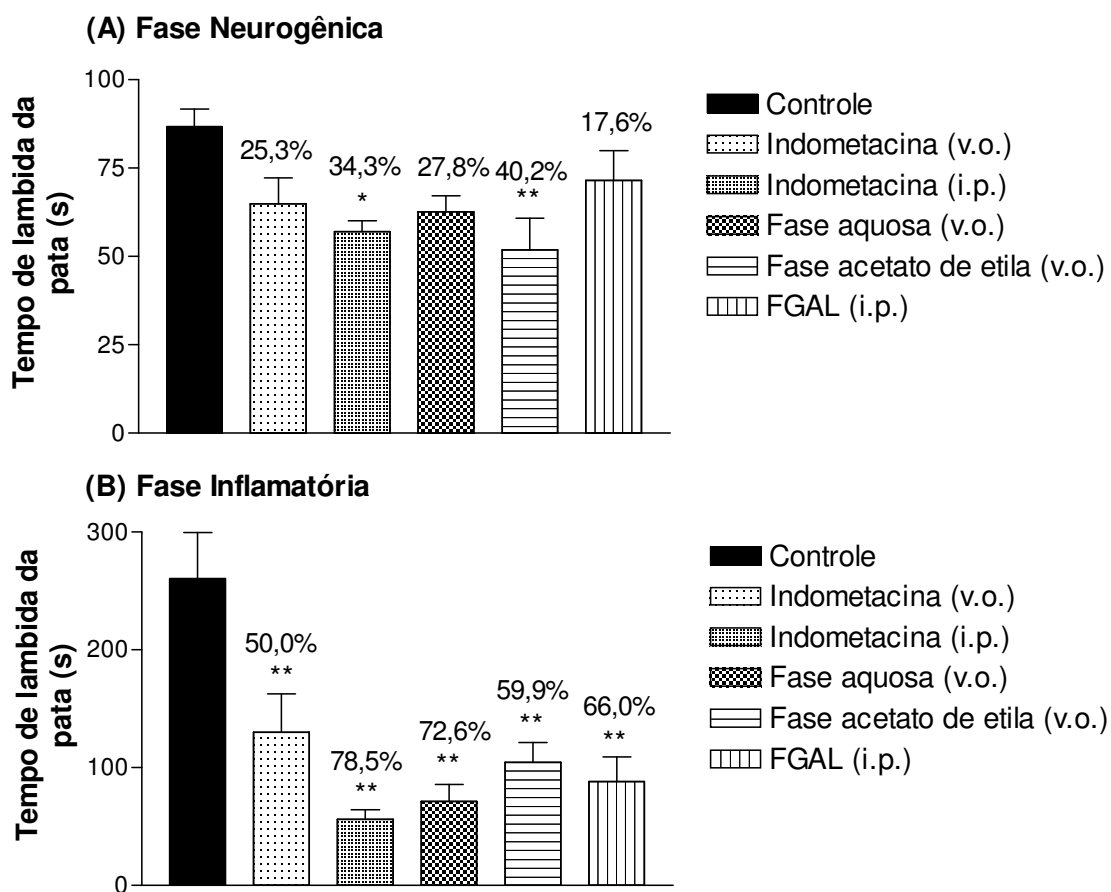


Figura 13. Perfil antihiperálgico da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/kg, v.o.), FGAL (100µmol/kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e morfina (15µmol/kg, s.c.) no ensaio da placa quente. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (*P<0,05, *p<0,01 no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).



Figuras 14A e 14B. Perfil antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato de etila (100 mg/ kg, v.o.), FGAL (100 μ mol/ kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e indometacina (100 μ mol/ kg, v.o. e i.p.) no teste de formalina (1^a fase – 14A e 2^a fase – 14B). Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnet).

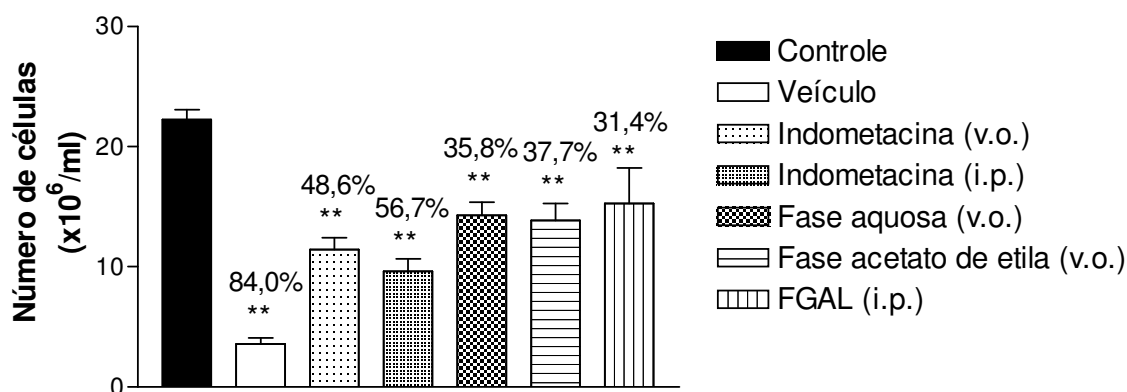


Figura 15. Perfil anti-inflamatório da fase aquosa (100 mg/kg, v.o.), fase acetato (100 mg/kg, v.o.), FGAL (100µmol/kg, i.p.) de *Piptadenia stipulacea* e indometacina (100µmol/kg, v.o. e i.p.) no ensaio de peritonite induzida por zymosan A. Os dados representam a média e o erro padrão da média de 6 animais (**P<0,01 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett).

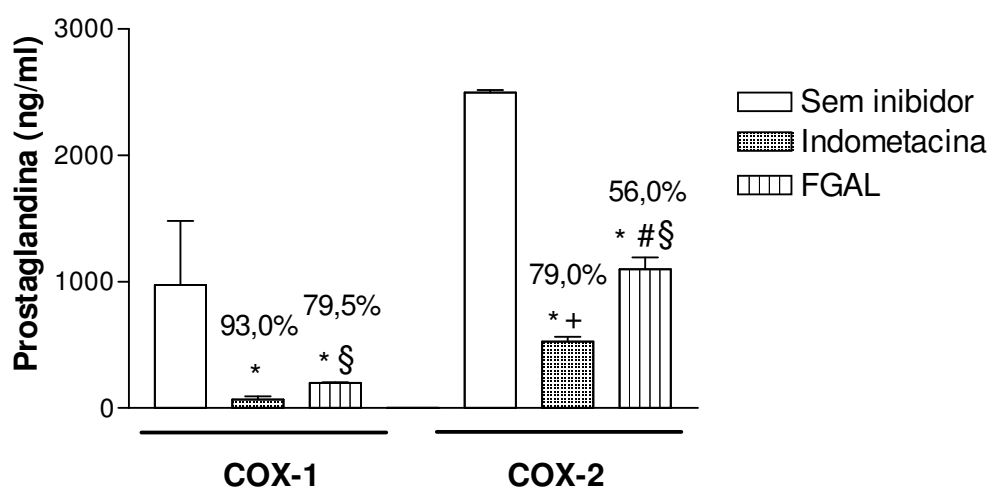


Figura 16. Inibição *in vitro* das enzimas COX-1/COX ovina por FGAL e indometacina, ambas nas concentrações de 0,2 µM. Os dados representam a média e o erro padrão da média de duplicatas de um experimento representativo (*P<0,05 foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste de ANOVA One Way seguido do teste de Dunnett; ; + P<0,05 quando a diferença entre os resultados obtidos com indometacina para COX-1 e COX-2 foi considerada significativa ao nível de 95% de confiança no teste t student; # P<0,05 quando a diferença entre os resultados obtidos com FGAL para COX-1 e COX-2 foi considerada significativa ao nível de 95% de confiança no teste t student; § P<0,05 quando a diferença entre os resultados obtidos com FGAL e indometacina para COX-1 ou COX-2 foi considerada significativa ao nível de 95% de confiança no teste t student).

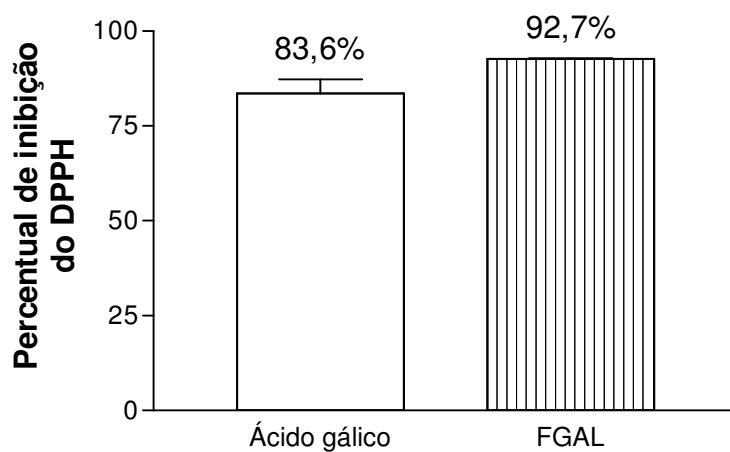


Figura 17. Atividade sequestrante de radicais de FGAL, flavonoide isolado das partes aéreas de *Piptadenia stipulacea* e do controle ácido gálico, todos na concentração de 0,3 mM. Os dados representam a média e o erro padrão da média de duplicatas de um experimento representativo (* $P < 0,05$ foi considerado significativo ao nível de 95% de confiança no teste t student).

6 DISCUSSÃO

Três diferentes modelos animais foram usados neste estudo para investigar o potencial antinociceptivo da fase aquosa (100 mg/kg), da fase de acetato de etila (100 mg/kg) e de FGAL (100 μ mol/kg) de *Piptadenia stipulacea*. Os métodos de investigação da atividade antinociceptiva foram selecionados com base em sua capacidade de poder apresentar tanto efeitos periféricos como central. O modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético, o ensaio de placa quente e o teste da formalina foram utilizados para investigar a atividade antinociceptiva. Além disso, o ensaio de peritonite induzida por zymosan A em camundongos foi utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória das fases acetato de etila e aquosa e do flavonoide. Realizou-se também ensaio *in vitro* de inibição de COX e da atividade sequestrante radicalar através do método de DPPH para se pesquisar o mecanismo de ação de FGAL.

O ensaio de contorção induzida por ácido acético é um modelo de dor visceral e é amplamente utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva periférica (VERMA et al., 2005; DU et al., 2007). Embora este teste seja um modelo inespecífico (por exemplo, anticolinérgicos, antidepressivos tricíclicos e anti-histamínicos e outros agentes mostram a atividade neste ensaio), é amplamente utilizado para a triagem de analgésicos periféricos, e envolve receptores peritoneais colinérgicos e histamínicos e os mediadores acetilcolina e histamina (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 1999; MIRANDA et al., 2001).

Este método tem sido, em geral, associado com prostanoídes, pois é observado o aumento dos níveis de PGE₂ e PGF_{2 α} em fluidos peritoneais, bem como produtos da LOX (VERMA et al., 2005). As vias de transmissão da dor inflamatória mais importantes são aquelas que incluem nociceptores periféricos sensíveis a prótons polimodais, como canais iônicos sensíveis a ácido (ASICs) e substâncias algésicas, tais como a bradicinina e citocinas. Estes receptores enviam sinais ao SNC via fibras C. Além disso, é bem estabelecido que a resposta nociceptiva causada pelo ácido acético é dependente também da liberação de algumas citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-8 através da modulação de macrófagos e mastócitos localizados na cavidade peritoneal (LUCENA et al., 2007).

Neste teste, os nossos resultados mostraram uma diminuição significativa no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, por todas as fases testadas. Além disso, quando FGAL foi administrado por via intraperitoneal apresentou maior efeito em relação à administração por via oral. Assim, supõe-se que este flavonoide não seja bem absorvido pelo trato gastrointestinal ou seja metabolizado muito rapidamente a produtos inativos. Portanto,

esses efeitos protetores no teste de contorções são menos pronunciados do que os de dipirona, utilizado como medicamento analgésico de referência, quando administrada tanto por via oral como por via intraperitoneal.

O teste da placa quente é um modelo nociceptivo central que tem seletividade para analgésicos opioides, como a morfina. Evidências experimentais obtidas neste modelo indicam que a fase de acetato de etila (100 mg/kg, v.o.) de *Piptadenia stipulacea* aumentou o tempo de latência de forma significativa ($P < 0,05$ camundongos e $P < 0,01$) no método nociceptivo da placa quente. Além disso, esta fase também inibiu significativamente ($P < 0,05$ e $P < 0,01$) as contorções induzidas por ácido acético em camundongos. Estas observações tendem a sugerir que a fase de acetato de etila pode possuir propriedades antinociceptivas centrais e periféricas. A morfina (15 μ mol/kg, s.c.) também aumentou significativamente os tempos de latência dos animais.

Os efeitos antinociceptivos periféricos das fases de *Piptadenia stipulacea* podem ser mediados através da inibição de COX e/ou LOX (e outros mediadores inflamatórios), enquanto a ação antinociceptiva central pode ser mediada através da inibição dos receptores da dor central ou inibição da síntese de PG via COX-3 (BALLOU et al., 2000; DOU et al., 2004; OJEWOLE, 2006).

O teste da formalina é um modelo constituído de duas fases distintas. A primeira fase é causada pela ação direta de formalina sobre as fibras sensoriais do tipo C, e a segunda fase está associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e pela liberação de mediadores nociceptivos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989). Foi relatado que a SP e a bradicinina participam no aparecimento das respostas da primeira fase, e histamina, serotonina, bradicinina e PGs estão envolvidos na respostas da segunda fase (DU et al., 2007).

No teste de formalina, que é sensível a vários tipos de analgésicos (HUNSKAAR; HOLE, 1987), nossos resultados mostraram que o tempo de lambida da pata foi significativamente reduzido pela administração oral da fase acetato de etila em ambas as fases. Neste teste, os medicamentos de ação central, como opioides, inibem as duas fases da mesma forma, enquanto que fármacos antinociceptivos periféricos, como AINEs e corticosteroides, só inibem a segunda fase (MIRANDA et al., 2001; EL HABAZI et al., 2006). Na verdade, o efeito das fases acetato de etila em ambas as fases do teste da formalina dá suporte a suposição que esta fase contém substâncias ativas com atividade antinociceptiva em nível central e periférico. Já o efeito antinociceptivo do FGAL e da fase aquosa na

segunda fase do teste de formalina indicam uma provável atividade anti-inflamatória para estes agentes.

Os flavonoides também são relatados por serem bons agentes antioxidantes e antinociceptivos, como a quercetina e a miricitrina. Além disso, muita atenção tem sido dada à relação entre propriedades antioxidante e anti-inflamatórias de flavonoides, *in vitro* e *in vivo* (NIJVELDT, 2001; MEOTTI et al., 2006; WILLAIN-FILHO et al., 2008). Os flavonoides têm sido reportados por inibirem COX, LOX, monooxigenases microssomais, glutathione S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADPH oxidase, todos os envolvidos na geração de ROS (ODONTUYA et al., 2005). Outra propriedade anti-inflamatória dos flavonoides é a sua capacidade de inibir a degranulação de neutrófilos (NIJVELDT., 2001).

Para confirmar a provável atividade anti-inflamatória das fases aquosa e acetato de etila, e de FGAL de *Piptadenia stipulacea*, foi utilizada o ensaio de peritonite induzida por zymosan A em camundongos. A peritonite é uma condição inflamatória frequente com morbidade e mortalidade severa, e sua etiologia infecciosa inclui bactérias, fungos e parasitas. O ensaio de peritonite induzida por zymosan A imita uma infecção por fungos (zymosan é um polissacarídeo componente das paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*) e representa um modelo bem caracterizado para estudos sobre a inflamação aguda peritoneal (KOLACZKOWSKA et al., 2008).

Neste teste, os resultados demonstraram que as fases aquosa e acetato de etila de *Piptadenia stipulacea* reduziram significativamente o número de células recrutadas, mostrando que essas fases contêm agentes ativos anti-inflamatórios. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo, o zymosan A induz um aumento no extravasamento vascular, um dos sinais preliminares da inflamação (RAO et al., 1994; BOUGHTON-SMITH; GHELANI, 1995). Esta é uma etapa chave na formação do exsudato inflamatório e é seguida por um recrutamento de células dependente de tempo, especialmente de neutrófilos (DOHERTY et al., 1985). Neste modelo, 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 (LEITE et al., 2007). Logo, as fases acetato de etila e aquosa, bem como FGAL de *Piptadenia stipulacea* diminuíram o recrutamento de leucócitos devido a sua provável capacidade de diminuir a produção dessas citocinas pró-inflamatórias. Além disso, é bem conhecido que ROS e proteases produzidas por neutrófilos ativados causam ou agravam reações inflamatórias. Foi demonstrado anteriormente que certos prostanoídes podem exacerbar várias funções dos neutrófilos. Tem sido sugerido que a inibição endógena de PGs

geradas é um dos mecanismos pelos quais os efeitos pró-inflamatórios dos neutrófilos são limitados (OKTAR et al., 2004).

Para verificar o mecanismo de ação pelo qual FGAL induz antinocicepção, bem como para comprovar se o mesmo apresenta atividade anti-inflamatória e antioxidante, foi realizados ensaios *in vitro* de avaliação da inibição de COX 1/COX 2 e da atividade sequestrante radicalar através do método de DPPH.

A capacidade de FGAL para inibir COX-1 e COX-2 ovinas foi determinada utilizando um kit imunoenzimático, de acordo com a metodologia descrito por UDDIN e colaboradores (2004). De acordo com os resultados obtidos, FGAL foi inibiu, significativamente, tanto COX-1 como COX-2, com um perfil de inibição similar ao observado para indometacina, no entanto com um menor efeito na concentração de 0,2 μ M.

A inibição da enzima COX por flavonoides pode se dar de forma direta ou indireta. Flavonoides podem se ligar diretamente a COX e, assim, inibir a enzima. Está bem descrito na literatura os requisitos estruturais dos flavonoides para inibição direta de fosfolipase A₂, COX e LOX: o anel fenil é o responsável pela inibição de fosfolipase A₂; o anel benzopirano é a porção a qual se liga a COX; e tanto o anel benzopirano como as hidroxilas em C5 e C7 do anel A são os grupos farmacofóricos para inibição de LOX (NARAYANA et al., 2001).

Indiretamente, flavonoides podem inibir COX por uma combinação de sequestro de radicais livres e uma interação com as funções de enzimas (NIJVELDT, 2001). Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestrante do radical livre DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem da atividade sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007).

Neste ensaio, verificou-se que o flavonoide FGAL atingindo 23,3% de consumo do DPPH no primeiro minuto, além disso, houve o aumento significativo do consumo de DPPH ao longo do tempo total de observação (15 min). Portanto, evidenciou-se que FGAL apresenta alta atividade sequestrante radicalar. Além disso, observou-se que após 15 min, FGAL consumiu 92,7% do DPPH, similar a consumida pelo controle positivo ácido gálico (83,6%), ambos na concentração de 0,3 mM.

Durante a catálise do ácido araquidônico, é necessária a oxidação do heme, como formação de hidroperóxido, radical oxiferrila e, posteriormente, radical tirosila no sítio ciclooxygenase da COX, que é responsável pela formação do radical araquidonila, o qual reage com o O₂ para a produção de PGG₂. PGG₂ é depois reduzida a PGH₂ no sítio peroxidase, com a produção de um intermediário de radicais livres que rapidamente se converte em um radical •OH (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; HÉTU; RIENDEAU, 2005; BINGHAM et al., 2006). FGAL pode atuar sequestrando radicais livres, inibindo assim de forma indireta a ação da COX. Além disso, flavonoides também são conhecidos por quelar o ferro, eliminando assim um fator causal para a produção de radicais livres (NIJVELDT, 2001).

ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são moléculas altamente ativas que contém um ou mais elétrons não pareados. ROS e RNS produzidas endogenamente são essenciais para a vida e estão envolvidas em várias funções biológicas (KIM et al., 2009). Em condições inflamatórias, NADPH oxidase presente em PMNs e células mononucleares é ativada e gera ROS. Além de seu papel defensivo como microbicida, ROS estão entre os mais potentes estímulos responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, de fatores quimiotáticos (LTB₄), da peroxidação lipídica na membrana plasmática e da oxidação do DNA. Assim, ROS desregulam a função celular e induz o dano tecidual, que, por sua vez, aumenta o estado inflamatório (ROOME et al., 2008).

Flavonoides com meta-5,7-diidroxi no anel A e ligação 2,3-dupla no anel C, em combinação com o 4-ceto, tais como FGAL descrito neste trabalho, podem ser inibidores potentes da COX-2 porque mostram importante atividade antioxidante. A presença de uma ligação dupla em C3 do anel C é um determinante importante desta atividade inibitória enzimática (RICE-EVANS et al., 1997; PASCUAL-TERESA et al., 2004). Os grupos hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A, em combinação com o 4-ceto no anel C dão indícios de que FGAL pode inibir NADPH oxidase (PIMENTEL, 2006). O grupo carbonila na posição 4 sobre o anel C também sugere uma inibição direta da peroxidação lipídica através da atividade antioxidante de FGAL (NIJVELDT, 2001; PIMENTEL, 2006).

Além disso, foi demonstrado anteriormente que este flavonoide é um bom inibidor da produção de NO (MORIKAWA et al., 2006). Existem também estudos mostrando que certos flavonoides, como a daidzeína, a genisteína, isorhamnetina, kaempferol, quercetina, naringenina e pelargonidina, diminuem a produção de NO em resposta a estímulos inflamatórios (HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Tem sido reportado na literatura científica que os compostos inibitórios da expressão ou atividade de iNOS são potenciais agentes anti-inflamatórios. iNOS é induzida por produtos

bacterianos e citocinas em macrófagos e algumas outras células (HÄMÄLÄINEN et al., 2007). A produção de NO pode não apenas é um marcador de ativação imune, mas pode realmente contribuir para a patogênese da doença como um modulador da fisiologia celular. A produção de NO está aumentada na inflamação e tem efeitos reguladores pró-inflamatórios. Tem sido demonstrado que o NO tem a capacidade de regular TNF- α , IL-8 e a própria iNOS, entre outros. Além disso, flavonoides (por exemplo, quercetina e rutina), que são distribuídos em várias plantas medicinais, são conhecidos por inibir a expressão de iNOS (CHO et al., 2006; HÄMÄLÄINEN et al., 2007).

Em relação aos requisitos estruturais de flavonoides para a inibição da produção de NO, três características principais são reportadas: a ligação dupla C2-C3 é uma característica comum em compostos efetivos, um grupo volumoso (por exemplo, glicosídeo, rhamnoside, rutinoside ou neohesperidosídeo) como um substituinte reduz ou abole os efeito inibitório do composto, grupos OH em C7 e C4' foram encontradas em todos os compostos eficazes em inibir iNOS (HÄMÄLÄINEN et al., 2007). Embora esses requisitos estruturais por si só não diferenciam compostos ativos e ineficazes, observa-se que a estrutura química FGAL possui todos eles, indicando que este flavonoide pode atuar inibindo iNOS.

Flavonoides também podem exercer efeito de diminuição da expressão de enzimas pró-inflamatórias (COX-2 e iNOS), através da ativação do receptor ativado de proliferador de peroxissoma gama (PPAR γ), regulação da homeostase do cálcio, tirosina cinases, NF- κ B, c-Jun, modulação de genes reguladores do ciclo celular. O flavonol FGAL também pode atuar como um ativador de PPAR γ , esta atividade também é dependente da estrutura: a ligação dupla em C2-C3 do anel C e os grupos hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A são importante para a ativação de PPAR γ (SOOBRAATTEE et al., 2005). A ativação do fator transcricional PPAR γ regula negativamente a inflamação através de vários mecanismos, como, por exemplo, através da inibição a via dos fatores de transcrição proteína ativadora-1 e NF- κ B (LAWRENCE et al., 2002; ZHAN et al., 2009).

Com base nos dados obtidos, a **Figura 18** esquematiza a hipótese do provável mecanismo de ação pelo qual FGAL desempenha suas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

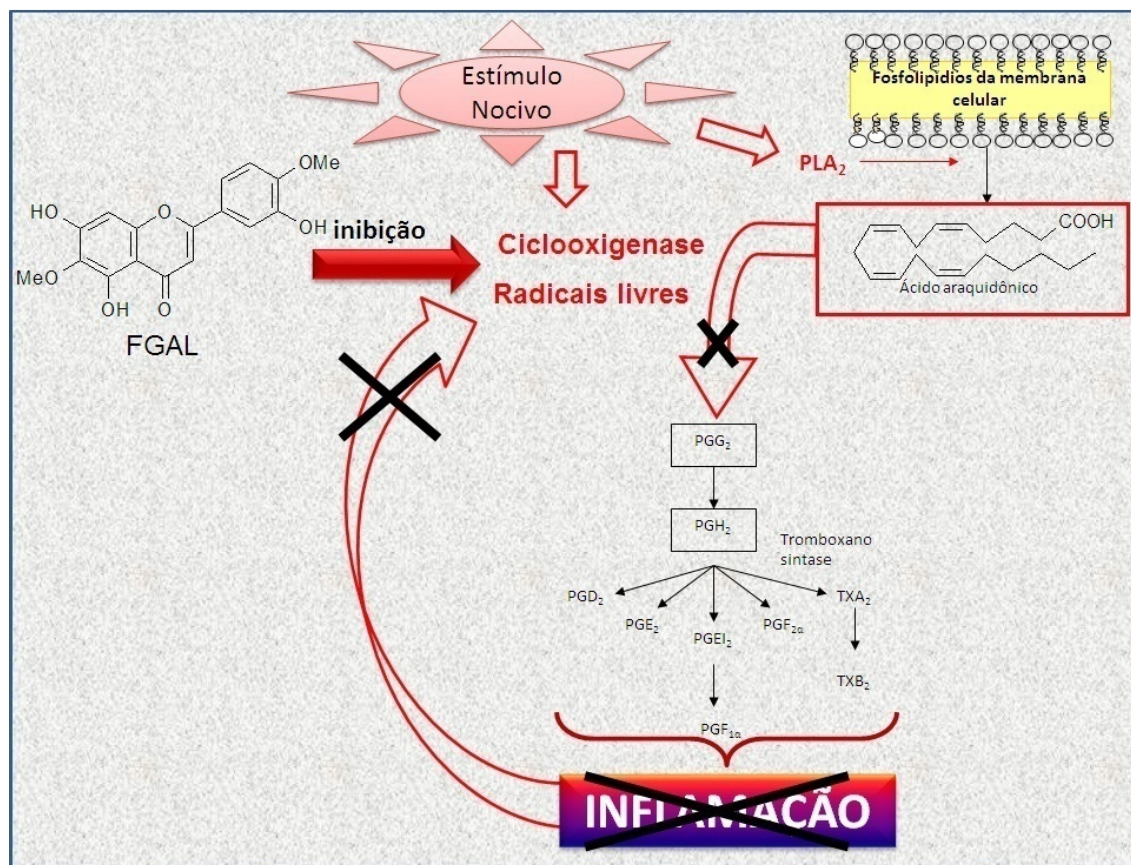


Figura 18. Esquema da hipótese do mecanismo de ação da atividade anti-inflamatória de FGAL. FGAL inibe COX, além de possuir atividade sequestrante radicalar, apresentando propriedades contra inflamação e nocicepção inflamatória.

Como pode ser visto na figura supra citada, um dos mecanismos de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória por FGAL envolve a inibição não seletiva de COX-1 e COX-2 (embora este flavonoide iniba em maior proporção a atividade de COX-1), devido, provavelmente, à sua comprovada atividade sequestrante de radicais livres. Porém, mais estudos são necessários para comprovar outros prováveis mecanismos das ações de FGAL e para confirmar se a inibição de COX ocorre de forma direto e/ou indireta. Além disso, os resultados encontrados dão suporte ao uso popular de *Piptadenia stipulacea* por suas propriedades anti-inflamatórias.

7 CONCLUSÕES

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sustenta a afirmativa de que as fases aquosa e acetato de etila e o flavonoide FGAL modulam a resposta nociceptiva e inflamatória aguda. O flavonoide FGAL inibe COX-1 e COX-2, provavelmente, por sua capacidade de sequestrar radicais livres, sendo esta um dos seus mecanismos de ação na nocicepção e inflamação. Além disso, os resultados encontrados dão suporte ao uso popular de *Piptadenia stipulacea* por suas propriedades anti-inflamatórias.

REFERÊNCIAS

AKCAY, A.; NGUYEN, Q.; EDELSTEIN, C.L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. **Mediators of Inflammation**, v.2009, p. 137072, 2009.

KENDENGUE, B. Medicinal plants used by the fang traditional healer in Equatorial Guinea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 165-173, 1992.

ALBUQUERQUE, U.P.; ANDRADE, L.H.C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**, v. 7, p. 336-346, 2002.

ALBUQUERQUE, U.P. Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the Caatinga vegetation of NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 30, p. 1-10, 2006.

AL-DABBA, M.M.; KITAHARA, K.; SUGANUMA, T.; HASHIMOTO, F.; TADERA, K. Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthema iphionoides* Boiss. Bioscience. **Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, p. 2178–2184, 2006.

ALEXANDRE-MOREIRA, M.S., PIUVEZAM, M.R., ARAÚJO, C.C., THOMAS, G.,. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 171–177, 1999.

ALMEIDA, A.; FELIX, W.J.P.; ANDRADE, L.A.; FELIX, L.P. Leguminosae na flora de inselbergues no Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 750-752, 2007.

AYOUB, S.S.; BOTTING, R.M.; GOORHA, S.; COLVILLE-NASH, P.R.; WILLOUGHBY, D.A.; BALLOU, L.R. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 11165-11169, 2004.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, p. 539- 545, 2001.

BALLOU, L.R.; BOTTING, R.M.; GOORHA, S.; ZHANG, J.; VANE, J.R. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 10272-10276, 2000.

BARBOSA, M.R.V.; LIMA, I.B.; LIMA, J.R.; CUNHA, J.P.; AGRA, M.F.; THOMAS, W.W. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 313-322, 2007.

BARNES, P.J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 245-154, 2006.

BARRETO, R.L.; CORREIA, C.R.D.; MUSCARÁ, M.N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

BARROS, N. Manifestações clínicas da dor crônica e princípios do tratamento. **Dor diagnóstico e tratamento**, v. 1, p. 3-10, 2004.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. Viçosa: Universitária, 1991, 309 p.

BARSANTE, M.M.; ROFFE, E.; YOKORO, C.M.; TAFURI, W.L.; SOUZA, D.G.; PINHO, V.; CASTRO, M.S.A.; TEIXEIRA, M.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, p. 282-289, 2005.

BASBAUM, A.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A.M.O.; Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, p. 58-60, 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.

BEZERRA, D.A.C. **Estudo fitoquímico bromatológico emicrobiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Universidade Federal de Campina Grande, Campo Grande, 2008.

BINGHAM, S.; BESWICK, P.J.; BLUM, D.E.; GRAY, N.M.; CHESSELL, I.P. The role of the cylooxygenase pathway in nociception and pain. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 544-554, 2006..

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199-1200, 1958.

BOUGHTON-SMITH, N.K.; GHELANI, A. Role of induced nitric oxide synthase and increased NO levels in zymosan peritonitis in the rat. **Inflammation Research**, v. 44, p. S149-S150, 1995.

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.

BRUM-JÚNIOR, L. Metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas. **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas** – Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p. 139 – 154, 2005.

CAMARGO, C.A. **Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos**. 2007. 80 f. Tese (Doutorado em Fisiologia na área de Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2007.

CAMPBELL, D.J. The kallikrein–kinin system in humans. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, p. 1060–1065, 2001

CANELLA, C.F.C.; TOKARNIA, C.H.; DOBEREINER, J. Experiments with plants supposedly toxic to cattle in northeastern Brazil, with negative results. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, p. 345-352, 1966.

CARDOZO, N.A.R. **Metabólitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J. F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae)**. 2006. 112 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CARNEIRO, L.A.; TÁVORA, F.R.F.; PONTE-SOUZA, M.H.L.; RIBEIRO, R.A. Ciclooxigenase-2 e câncer: uma breve revisão. **Pesquisa Médica**, v. 2, p.39-45, 2004.

CARVALHO-JÚNIOR, R.J. Técnicas farmacológicas de tratamento da dor. **Dor é coisa séria**, v. 53, p. 21-24, 2006.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 221-241, 1998.

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

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

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

CHIAPPETA, A.D.A.; DE MELLO, J.F. Higher plants with biological activity. Plants of Pernambuco. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 11, p. 99–111, 1984.

CHO, J.Y., PARK, S.C., KIM, T.W., KIM, K.S., SONG, J.C., KIM, S.K., LEE, H.M., SUNG, H.J., HWA-JIN PARK, H.J., YONG-BEOM SONG, Y.B., EUN-SOOK YOO, E.S., CHOONG-HWAN LEE, C.H., RHEE, M.H..Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 113-119, 2006.

CÓDULA, E.; QUEIROZ, L.P.; ALVES, M. Checklist da flora de Mirandiba, Pernambuco: Leguminosae. **Rodriguésia**, v. 59, p. 597-602, 2008.

COOLIER, H. O. J., DINNEN, L. C., SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.

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

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 429, p. 161–176, 2001

CUNHA, T. M.; VERRI-JÚNIOR, W. A.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T.M., DAL-SECCO, D., VERRI-JÚNIOR, W.A., GUERRERO, A.T., SOUZA, G.R., VIEIRA, S.M., LOTUFO, C.M., NETO, A.F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 127–135, 2008.

DAMIANI, D.; KUPERMAN, H. DICHTCHEKENIAN, V.; MANNA, T.D.; SETIAN, N. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo–benefício. **Pediatria**, v. 1, p. 71-82, 2001.

DE VRIES, E. F.; DOORDUIN, J.; DIERCKX, R. A.; VAN WAARDE, A. Evaluation of [(11)C]rofecoxib as PET tracer for cyclooxygenase 2 overexpression in rat models of inflammation. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, p. 35-42, 2008.

DHAKA, A.; UZZELL, V.; DUBIN, A.; MATHUR, J.; PETRUS, M.; BANDELL, M.; PATAPOUTIAN, A. TRPV1 senses both acidic and basic pH. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 153-158, 2009.

DOHERTY, N. X.; POUBELLE, P.; BERGEAT, 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.

DOU, W.; JIAO, Y.; GOORHA, S.; RAGHOW, R.; BALLOU, L.R. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 74, p. 29–43, 2004.

DU, J.; YU, Y.; KE, Y.; WANG, C.; ZHU, L.; QIAN, Z.M. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. **Journal of Ethnopharmacology** 112, 211–214, 2007.

DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B₁ receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 125–131, 2009.

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.

EL HABAZI, K.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; ZYAD, A.; CHAIT, A.; DALAL, A. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 406–411, 2006.

ELSOHLY, H.N.; EL-FERALY, F.S.; JOSHI, A.S.; WALKER, L.A. Antiviral flavonoids from *Alkanna orientalis*. **Planta Medica**, v. 63, p. 384, 1997.

FABRICANTE, J.R.; ANDRADE, L.A. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Seridó Paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 341–349, 2007.

FELDMANN, M.; BRENNAN, F.M.; MAINI, R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annual Review Immunology**, v. 14, p. 397-440, 1996.

FERREIRA, D.T.; FACCIONE, M. Opiáceos, Opioides de ação analgésica e antagonistas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, p. 125-136, 2005.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 265-271, 2000.

FLORENTINO, A.T.N.; ARAÚJO, E.L.; ALBUQUERQUE, U.P. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da Caatinga, Município de Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v. 21, p. 37–47, 2007.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 10-28, 2006.

FUJINO, H.; REGAN, J.W. Prostanoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase: a pathway to cancer? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, 335-340, 2003.

FÜRST, Z. Central and peripheral mechanisms in antinociception: current and future perspectives. **Neuropsychopharmacologia Hungarica**, v. 10, p. 127-130, 2008.

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.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Fármaco**, v. 56, p. 683–687, 2001.

HAI-BO, L.; ZHAN-LI, W.; YING-XIN, Q.; JIA-JU, Z. Flavonoids with aldose reductase inhibiting activity: pharmacophore modeling and implications for mechanism. **Wuli Huaxue Xuebao**, v. 23, p. 1059–1064, 2007.

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEM, M.; MOILANEN, E. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit stat-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on inos expression and no production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2007, p. 45673, 2007.

HARBORNE, J.B. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. Londres: Academic Press Inc. LTD., 1971.

HENCKER, G.A.; HUSTON, M.J. Yopo, a south American Snuff. **Canadian Pharmaceutical Journal**, v. 83, p. 8-9, 1950.

HÉTU, P.O.; RIENDEAU, D. Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 561–566, 2005.

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. Londres: BT Bastsford, 1996.

HUCHO, T.; LEVINE, J.D. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, 55, p. 365-76, 2007.

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

IVERSEN, L.; CHAPMAN, V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 50–55, 2002.

JAN, S.A. Introduction: Landscape of Opioid Dependence. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 16, S4-S8, 2010.

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

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 483-498, 2003.

KIDD, L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, p. 3-11, 2001.

KIELLAND, A.; CARLSEN, H. Molecular imaging of transcriptional regulation during inflammation. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 20, 2010.

KIM, Y.A.; KONG, C.S.; UM, Y.R.; LIM, S.Y.; YEA, S.S.; SEO, Y. Evaluation of Salicornia herbacea as a Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 661–668, 2009.

KLEIN, A.L. **Eugen Warming e o cerrado brasileiro**. São Paulo: Unesp, p. 131-145, 2000.

KOLACZKOWSKA, E.; ARNOLD, B.; OPDENAKKER, G. Gelatinase B/MMP-9 as na inflammatory marker enzyme in mouse zymosan peritonitis: comparison of phase-specific and cell-specific production by mast cells, macrophages and neutrophils. **Immunobiology**, v. 213, p. 109–124, 2008.

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.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios Não Esteroides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, p. 498-512, 2002.

KURAISHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H.. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **BrainResearch**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LAVICH, T.R.; CORDEIRO, R.S.B.; CALIXTO, J.B.; SILVA, P.M.R. E; MARTINS, M.A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, p. 185– 192, 2003.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. ANTI-INFLAMMATORY LIPID MEDIATORS AND INSIGHTS INTO THE RESOLUTION OF INFLAMMATION. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

LEACH, D.; STEVENSON, L.; GABRIEL, B.; BEATTIE, K. Biologically active compounds isolated from Centipeda and their biological activity as antioxidant and antiinflammatory agents. **PCT Patent Filing**, p. 49, 2007.

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

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. 1. ed. Londres: Kew Publishing, 1987. 99 p.

LEWIS, G. P. Five new taxa of Piptadenia (Leguminosae: Mimosoideae) from Brazil. **Kew Bulletin**, v. 46, p. 159-168, 1990.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the Word**. Londres: Kew Publishing, 2005, 577 p.

LIMA-JÚNIOR, R.C.P. **Efeitos antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos α - e β -amirina em modelos de nocicepção visceral em camundongos**. 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LIRA, D.P. **Flavonoides isolados de *Piptadenia stipulacea* (Benth.) Ducke (FABACEAE)**. 2009. 171 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

LOBO, C.; MARRA, V.N.; SILVA, R.M.G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 247-258, 2007.

LUCAS, S.M.; ROTHWELL, N.J.; GIBSON, R.M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S232–S240, 2006.

LUCENA, G.M.R.S.; GADOTTI, V.M.; MAFFI, L.C.; SILVA, G.S.; AZEVEDO, M.S.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 19–25, 2007.

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

MAIA, G.N. **Thumb_515494131.JPG**. 2000. Altura: 150 pixels. Largura: 99 pixels. 5,1 Kb. Formato JPEG. In: Centro Nordestino de informações sobre plantas. Banco de Dados de Plantas do Nordeste. Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/bdpn>>. Acesso em: 12 mar. 2010.

MBOUANGOUERE, R.N.; TANE, P.; NGAMGAA, D.; DJEMGOUA, P.; CHOUDHARYB, M.I.; NGADJUI, B.T. Pipterol from *Piptadenia africana* L. **The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 4, p. 294–298, 2007.

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

MEOTTI, F.C.; LUIZ, A.P.; PIZZOLATTI, M.G.; KASSUYA, C.A.L.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A.R.S., Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 789–796, 2006.

MIRANDA, F.G.G.; VILAR, J.C.; ALVES, I.A.N.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, v. 1, p. 1–16, 2001.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105–111, 2001.

MORIKAWA, T.; ABDEL-HALIM, O.B.; MATSUDA, H.; ANDO, S.; MURAOKA, O.; YOSHIKAWA, M. Pseudoguaiane-type sesquiterpenes and inhibitors on nitric oxide production from *Dichrocephala integrifolia*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 6435–6442, 2006.

NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v.33, p. 2-16, 2001.

NEILSON, I.C. Momosaceae (Leguminosae-Mimosoideae). *In*: NEILSON, I.C. **Flora Malesiana**, v. 11, Part 1. Leiden: Rijksherbarium, 1992.

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.

ODONTUYA, G.; HOULT, J.R.S. HOUGHTON, P.J. Structure–activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 782–786, 2005.

OJEWOLE, J.A.O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. and C.A. Mey. (Hypoxidaceae) corm [‘African Potato’] aqueous extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 126–134, 2006.

OKTAR, B.K.; YUKSEL, M.; ALICAN, I. The role of cyclooxygenase inhibition in the effect of α -melanocyte-stimulating hormone on reactive oxygen species production by rat peritoneal neutrophils. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 71, p. 1–5, 2004.

OLIVEIRA, G.L. **Mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pela agmatina em camundongos**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005a.

OLIVEIRA, M.A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. 2005. 72 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005b.

ONG, C.K.S.; LIRK, P.; TAN, C.H.; SEYMOUR, R.A. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Clinical Medicine & Research**, v. 5, p.19-34, 2007.

PASCUAL-TERESA, S.; JOHNSTON, K.L.; DUPONT, M.S.; O’LEARY, K.A.; NEEDS, P.W.; MORGAN, L.M.; CLIFFORD, M.N.; BAO, Y.; WILLIAMSON, G. Quercetin metabolites downregulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 552–557, 2004.

PASINETTI, G.M. Cyclooxygenase and Inflammation in Alzheimer's Disease: Experimental Approaches and Clinical Interventions. **Journal of Neuroscience Research**, v. 54, p.1–6, 1998.

PEREIRA, I.M.; ANDRADE, L.A.; COSTA, J.R.M.; DIAS, J.M. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. **Acta Botanica Brasílica**, v. 15, p. 413-426, 2001.

PIMENTEL, F.O. **Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica**. 2006. 111 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

RAJAKARIAR, R.; YAQOOB, M.M.; GILROY, D.W. Cox-2 in inflammation and resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, p. 199- 207, 2006.

RAO, T.S.; CURRIE, J.L.; SHAFFER, A.F.; ISAKSON, P.C. *In vivo* characterization of zymosan-induced mouse peritoneal inflammation. **Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 269, p. 917–925, 1994.

RAO, Y.R.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 249–253, 2005.

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.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152–159, 1997.

RICHARDSON, J.D; VASKO, M.R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p. 839-845, 2002.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Differential Induction of Complement Fragment C5a and Inflammatory Cytokines during Intramammary Infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 161–167, 2000.

ROOME, T.; DAR, A.; ALI, S.; NAQVI, S.; CHOUDHARY, M.I. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 514–521, 2008.

ROSENBLOOM, R.A. Flavonoid compositions for the treatment of skin disorders. **Patent Application Publication**, p. 11, 2003.

ROSENBLOOM, R.A. Methods using antioxidant flavonoid compounds for the treatment of peripheral neural and vascular ailments. **Patent Application Publication**, p. 11, 2004.

ROUZER, C.A.; MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S29-S34, 2009.

SALES, M. F.; MAYO, S. J.; RODAL, M. J. N. **Plantas vasculares das florestas serranas de Pernambuco**: um checklist da flora ameaçada dos brejos de altitude. Recife: UFRPE, 1998. 130 p.

SALZBERG-BREHOUSE H.C., CHEN, E.; EMERICH, D.F.; BALDWIN, S.; HOGELAND, K.; RANELLI, S.; LAFRENIERE, D.; PERDOMO, B.; NOVAK, L.; KLADIS, T.; FU, K.; BASILE, A.S.; KORDOWER, J.H.; RAYMOND, T. Inhibitors of Cyclooxygenase-2, but Not Cyclooxygenase-1 Provide Structural and Functional Protection against Quinolinic Acid-Induced Neurodegeneration. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 218–228, 2003.

SANTANA, J.A.S.; SOUTO, J.S. Diversidade e estrutura fitossociológica da caatinga na Estação Ecológica do Seridó-RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, 2006.

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 Básicas e Aplicadas**, v.28, p.235-240, 2007.

SARAIVA, J.; OLIVEIRA, S.M; ROCHA-SOUSA, A.; LEITE-MOREIRA, A. Receptores Opioides e Pré-Condicionamento Isquêmico do Coração. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 23, p. 1317-1333, 2004.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-151, 2006.

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

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.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. CYCLOOXYGENASES: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 145–182, 2000.

SOOBRAATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. São Paulo: Nova Odessa, 2008.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. **Pain**, v. 68, p. 95-208, 1996.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacology Review**, v. 51, p.159-211, 1999.

TUCKER, S.C. Floral development in legumes. **Plant Physiology**, v. 131, p. 911-926, 2003.

TURNBULL, C.M.; CENA, C.; FRUTTERO, R.; GASCO, A.; ROSSI, A.G.; MEGSON, I.L. Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivatives of aspirin in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 517-526, 2006.

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

UDDIN, J.; RAO, P.; PRAVEEN, N.; KNAUS, E.E. Design and synthesis of acyclic triaryl (Z)-olefins: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5929–5940, 2004.

UNDAS, A.; BRUMMEL-ZIEDINS, K.E.; MANN, G.K. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. **Blood**, v. 109, p. 2285-2292, 2007.

VANNI, D.S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A.M.; DAHER, J.P.L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 181-189, 2007.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p. 1-7, 2006.

VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R.T.; MENDES-FILHO, P.F. Ocorrência de rizóbios e endomicorrizas em leguminosas arbóreas e arbustivas do estado do Ceará. **Ciência Agrônômica**, v. 15, p. 45-52, 1984.

VERMA, P.R.; JOHARAPURKAR, A.A.; CHATPALLIWAR, V.A.; ASNANI, A.J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298-301, 2005.

VERRI-JÚNIOR, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VODOVOTZ, Y.; CSETE, M.; BARTELS, J.; CHANG, S.; AN, G. Translational systems biology of inflammation. **PLoS Computational Biology**, v. 4, p. e1000014 (advance online publication), 2008.

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.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S.E.; WHISTLER, J.L. OPIOID RECEPTORS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 953-990, 2004.

WARNER, T.D.; MITCHELL, J.A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13371-13373, 2002.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v.454, p.427, 2008.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 701–718 , 2006.

WILLAIN-FILHO, A.; CECHINEL-FILHO, V.; OLINGER, L.; SOUZA, M.M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of Pharmacol Research**, v. 31, p. 713–721, 2008.

WILLAMAN, J.J.; LI, H.L. Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids. **Lloydia**, v. 33S, p. 1– 286, 1970.

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

WOJCIECHOWSKI, M.F. Reconstructions the phylogeny of legumes (Leguminosae): na early 21st century perspective. **Royal Botanic Gardens**, Advances in Legumes Systematics, part 10, Higher Level Systematics, p. 5-35, 2003.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353-364, 2007.

WU, J.T.; WU, L.L. Acute and Chronic Inflammation: Effect of the Risk Factor (s) on the Progression of the Early Inflammatory Response to the Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of Biomedical and Laboratory Science**, v. 19, p. 71-75, 2007.

ZELADA, F.; CONI, H. **Contribution to the study of *Piptadenia cebil***. Tese, Unicersidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, p. 72, 1915.

ZHAN, Y.; YUAN, L.; OETTGEN, P. Alterations in transcriptional responses associated with vascular aging. **Journal of Inflammation**, v. 6, p. 1-5, 2009.

ZIMMERMAN, M., Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109-110, 1983.

APÊNDICE 1



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharmThe antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae)

Aline Cavalcanti de Queiroz^a, Daysianne Pereira de Lira^b, Thays de Lima Matos Freire Dias^a, Éverton Tenório de Souza^a, Carolina Barbosa Brito da Matta^a, Anansa Bezerra de Aquino^a, Luiz Henrique Agra Cavalcante Silva^a, Diogo José Costa da Silva^a, Eliane Aparecida Campessato Mella^a, Maria de Fátima Agra^b, José Maria Barbosa Filho^b, João Xavier de Araújo-Júnior^{c,d}, Bárbara Viviana de Oliveira Santos^b, Magna Suzana Alexandre-Moreira^{a,*}

^a LaFI - Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

^b Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, PB, Brazil

^c Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

^d Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 September 2009

Received in revised form

30 November 2009

Accepted 18 January 2010

Available online 25 January 2010

Keywords:

Antinociceptive

Anti-inflammatory

Piptadenia stipulacea

Flavonoids

ABSTRACT

Aim: In this study, we attempted to identify the possible antinociceptive and anti-inflammatory actions of the aqueous phase, the ethyl acetate phase and one unknown flavonoid obtained from aerial parts of *Piptadenia stipulacea*, known in Brazil as “jurema-branca”, “carcará” and “rasga-beiço”.

Materials and methods: Aerial parts of *Piptadenia stipulacea* were used and after fractionation, the flavonoid FGAL was obtained. Experiments were conducted on Swiss mice using the acetic acid-induced writhing test, the hot plate test, the formalin-induced pain test and zymosan A-induced peritonitis test.

Results: The aqueous and ethyl acetate phases (p.o., 100 mg/kg); and the flavonoid FGAL (p.o. and i.p. at 100 µmol/kg), reduced the nociception produced by acetic acid, by 49.92%, 54.62%, 38.97% and 64.79%, respectively. *In vivo* inhibition of nociception by the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) in the hot plate test was favorable, indicating that this fraction exhibited central activity. The ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) reduced the formalin effects in both phases by 28.51% and 55.72%, respectively. Treatment with the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.) and FGAL (100 µmol/kg, i.p.) only protected the second phase by 69.76% and 68.78%, respectively. In addition, it was observed in the zymosan A-induced peritonitis test that the aqueous phase, the ethyl acetate phase and the FGAL exhibited anti-inflammatory activity, reducing significantly the number of recruit cells by 35.84%, 37.70% and FGAL (1), respectively. **Conclusions:** These data demonstrate that the FGAL elicits pronounced antinociceptive activity against several pain models. The actions of this flavonoid probably are due to antioxidative properties. However, pharmacological and chemical studies are continuing in order to characterize the mechanism(s) responsible for this antinociceptive action and also to identify other active substances present in *Piptadenia stipulacea*.

Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Inflammation is the body's immediate response to damage its tissues and cells by pathogens, noxious substances such as chemicals, or physical injury (Weiss, 2008). Inflammatory processes are required for immune surveillance, optimal repair, and regeneration

after injury (Vodovotz et al., 2008). However, sustained, excessive or inappropriate inflammation is the cause of numerous diseases including rheumatoid arthritis, psoriasis and inflammatory bowel disease. Inflammation is a major component of the damage caused by autoimmune diseases, and is a fundamental contributor to diseases such as cancer, diabetes and cardiovascular disease (Lucas et al., 2006).

Locally, inflammation develops in the classical forms of swelling, redness, heat and often pain. The common instigators of inflammation are at one end of a large range of adverse conditions that induce inflammation, and they trigger the recruitment of leukocytes and induction or activation of inflammatory mediators such as kinins, cyclooxygenase products and cytokines. Many of these molecules

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Setor de Fisiologia e Farmacologia, ICBS, Universidade Federal de Alagoas, Praça Afrânio Jorge, SN, Bairro Prado, CEP 57020-720 Maceió, Alagoas, Brazil. Tel.: +55 82 33363444; fax: +55 82 32212501.

E-mail address: suzanamagna@yshoo.com.br (M.S. Alexandre-Moreira).

are produced locally and have proven involvement in tissue inflammation, and are thus key targets for therapeutic intervention in a range of diseases (Lucas et al., 2006; Medzhitov, 2008).

Pain is one of the classical signs of the inflammatory process in which sensitization of the nociceptors is the common denominator. This sensitization causes hyperalgesia or allodynia in humans, phenomena that involve pain perception, and is better described as nociception in animal models (Verri-Júnior et al., 2006; Cunha et al., 2008).

Clinical treatment of inflammatory diseases is dependent on drugs, which belong either to the non-steroidal or to the steroidal chemical groups (Yonathan et al., 2006). The continued search for potentially effective and safe anti-inflammatory agents cannot be over-emphasized. The use of herbal extracts and nutritional supplements either as an alternative or as a complementary medicine to conventional chemotherapy for the treatment of inflammatory diseases is well documented in Ayurveda, which is an alternative medicinal system that has been practiced primarily in the Indian subcontinent for 5000 years (Rao et al., 2005). Flavonoids are examples of herbal compounds normally reported for their antioxidant and anti-inflammatory properties (Hämäläinen et al., 2007). They are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in foods of plant origin. Over 4000 different flavonoids have been described, and they are categorized into flavonols, flavones, catechins, flavanones, anthocyanidins and isoflavonoids. Flavonoids are normal constituents of the human diet and are known for their variety of biological activities (Guardiã et al., 2001; Hämäläinen et al., 2007).

The *Piptadenia stipulacea* species (Family: Fabaceae; subfamily Mimosoideae; tribe Mimoseae) has two synonyms, *Piptadenia communis* var. *stipulacea* Benth and *Pityrocarpa stipulacea* (Benth) Brenan, although the only phytochemical investigation done, described only the isolation of the indole alkaloid, bufotenine from *Piptadenia communis* (Willaman and Li, 1970). *Piptadenia stipulacea* is popularly known as “jurema-branca” (Fabricante and Andrade, 2007), “jurema malícia-da-serra”, “carcará” and “calumbi” (Florentino et al., 2007) in the Northeast of Brazil and is largely distributed in the northeast caatinga biome, from the states of Piauí to Bahia (Barbosa et al., 2007). It is found extensively on roads and can support high levels of vegetation degradation (Pereira et al., 2001). It is commonly used as food for ovine, caprine and bovine, mainly during the dry season, when there is no pasture (Bezerra, 2008).

The stem, bark and leaves of *Piptadenia stipulacea* are used in folk medicine as a tincture or decoction to treat wounds (Albuquerque and Andrade, 2002). They are also indicated as a cicatrizing (Bezerra, 2008). In pharmacological studies of *Piptadenia stipulacea*, its leaves were active against multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains and against *Candida albicans* (Bezerra, 2008). In another studies, *Piptadenia stipulacea* extracts were also shown to be effective against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium* and *Neurospora crassa* (Chiappeta and De Mello, 1984).

However, to date there have been no investigations supporting the pharmacological properties of this plant. The intention of this study was therefore to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the aqueous phase and ethyl acetate phase in animal models. Due to the fact that the ethyl acetate fraction displayed the greatest inhibition in models of nociception, it was submitted to bioassay-guided fractionation for the ethyl acetate phase, using adsorption column chromatography (CC), which led to the isolation and identification of the flavonoid FGAL. Although within Fabaceae these flavonoids are not that rare, FGAL was isolated for the first time in the Fabaceae family and it showed some pharmacological properties, such as an aldose reductase inhibitor (Hai-Bo et al., 2007), antioxidant activity (Leach et al., 2007), an α -amylase inhibitor (Al-Dabba et al., 2006), a nitric

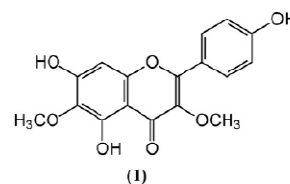


Fig. 1. Chemical structure of the flavonoid FGAL (1).

oxide production inhibitor (Morikawa et al., 2006), active in peripheral and neural vascular diseases (Rosenbloom, 2004), to treat skin diseases (Rosenbloom, 2003), as an antiviral (Elsouly et al., 1997), among others.

Their biological activities are reported in this paper. The pharmacological test was utilized in order to check whether this flavonoid was the compound responsible for the biological activity exhibited by the ethyl acetate phase.

2. Materials and methods

2.1. Plant samples

Aerial parts of *Piptadenia stipulacea* Benth. were collected in the city of Serra Branca, in the state of Paraíba, Brazil, in March of 2005. The samples were identified by Dr. Maria de Fátima Agra, a botanist from LTF/UFPB. A voucher, Agra et al. 3331 (JPB) was deposited in the Herbarium Lauro Pires Xavier in the Department of Botany at the Federal University of Paraíba (João Pessoa, PB, Brazil).

2.2. Extraction, fractionation and isolation

2.2.1. Preparation of the ethanol extract

Aerial parts of *Piptadenia stipulacea* (1200 g) were dried in an oven at 40 °C for 96 h, then, powdered and macerated with 96% ethanol at room temperature for 72 h. The solution was filtered and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator oven at 50 °C, producing 243 g of crude ethanol extract.

2.2.2. Fractionation of the ethanol extract

The ethanol extract was dissolved in methanol:water (3:7, v/v), producing a hydroalcoholic solution that was submitted to liquid–liquid partitions successively with hexane and ethyl acetate. The solutions produced were dried in anhydrous Na_2SO_4 and submitted to filtration under reduced pressure. Thereafter, the solvents were evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator oven at 50 °C, producing hexane (95 g), ethyl acetate (130 g) and aqueous phases (142 g).

2.2.3. Isolation of the flavonoid FGAL

The ethyl acetate phase was submitted to adsorption column chromatography with silica gel 60 as the stationary phase. The solvents hexane, chloroform and methanol were used as eluents. One hundred and fifty-six fractions were collected, which were then concentrated in a rotary evaporator. Subsequently, the fractions were analyzed using analytical thin layer chromatography to evaluate the level of purity of the substances in order to regroup them according to their retention factors. The 156 fractions were regrouped into 28 fractions after analytical TLC. Moreover, the Fraction's F-101 that precipitated was purified and identified using UV spectral data, IR, ^1H NMR and ^{13}C NMR as a known flavonoid FGAL (1) (Fig. 1). This compound, FGAL, will be called by the initials FGAL.

2.3. Pharmacological assays

2.3.1. Animals

Experiments were conducted using adult Swiss mice weighing 20–30 g each, males or females, at about 6–8 weeks of age, and distributed in groups of 6–8 animals per treatment. All animals came from the breeding unit of the BIOCEN – UFAL. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25–28 °C under a controlled 12 h light/dark cycle. All the animals used in this work were treated according to the norms established by the Ethics Committee – UFAL (number: 006443/2005–78) for animal handling.

2.3.2. Drugs and reagents

The chemicals and the drugs used in this study were acetic acid (Merck), arabic gum (Sigma–Aldrich), dypirone (Sigma Chemical), indomethacin (Merck), morphine sulphate (Dimorf-Cristalia-BR), zymosan A (Sigma–Aldrich) and Tween 20 (Sigma). A solution of formalin (2.5%) was prepared with formaldehyde (Merck) in saline solution (NaCl 0.9%). The aqueous and ethyl acetate phases were used as suspensions in Tween 20 (0.05%) and arabic gum (vehicle) in all the experiments. FGAL was administrated as a suspension in Tween 20 (0.05%) for the writhing test and arabic gum (vehicle) as a solution in saline in all the experiments.

2.3.3. Acetic acid-induced writhing

This test was performed as described by Collier et al. (1968), Koster et al. (1959) and Fontenele et al. (1996). Acetic acid (0.6%, v/v) was administered i.p., at a volume of 0.1 mL/10 g. The number of writhes, a response consisting of contraction of the abdominal wall, pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min beginning from 5 min after the acetic acid injection. The aqueous phase (100 mg/kg, body wt., p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, body wt., p.o.), the FGAL (100 µmol/kg, body wt., p.o. or i.p.) or the reference drug (dypirone, 100 µmol/kg, i.p.) were administered 60 min before the acetic acid injection. Antinociceptive activity was expressed as percent inhibition of the usual number of writhings observed in control animals.

2.3.4. The hot plate test

The mice were treated according to the method described by Franzotti et al. (2000). The animals ($n=6$) were placed on a hot plate set at 55 ± 1 °C. Reaction time was recorded when the animals licked their fore and hind-paws and jumped at 30, 60, 90 and 120 min after administration of the aqueous phase, the ethyl acetate phase (100 mg/kg, body wt., p.o.), the FGAL (100 µmol/kg, body wt., i.p.) or the reference drug (morphine, 15 µmol/kg, s.c.). The baseline was considered as the mean reaction time obtained at 30 and 60 min before administration of the phases or compound or morphine and was defined as the normal reaction of the animal to temperature.

2.3.5. Formalin-induced pain in mice

The procedure used was essentially the same as that described previously (Hunskar and Hole, 1987; Tjølsen et al., 1992). Animals received a dose of 20 µL of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde, in saline) on the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase) and the time that they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception. Animals received the aqueous phase and the ethyl acetate phase (100 mg/kg, body wt., p.o.), the FGAL (100 µmol/kg, body wt., i.p.) or the reference drug (indomethacin, 100 µmol/kg, p.o.) 40 min before. Control animals received only the vehicle (arabic gum).

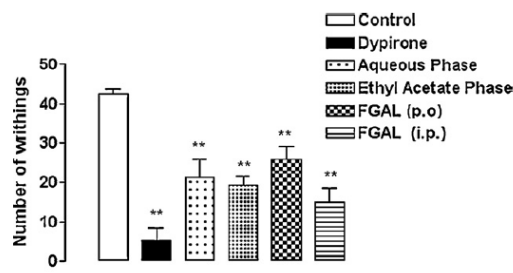


Fig. 2. Antinociceptive effect of aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.), FGAL (100 µmol/kg, p.o. or i.p.) and dypirone (100 µmol/kg, i.p.) on acetic acid-induced writhings in mice. Each column represents a mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, ** $P < 0.01$.

2.3.6. Zymosan A-induced peritonitis

For this series of experiments, the method described by Doherty et al. (1985) and Kolaczowska et al. (2001) was used. Zymosan A (Sigma–Aldrich) was freshly prepared (2 mg/mL) in sterile 0.9% (w/v) saline, and 0.5 mL was injected i.p. The animals were then killed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 1.5 mL cold PBS, and after 6 h of gentle manual massage, the exudate was retrieved and its volume was measured. The fresh exudate was used for cell counts and cytospin preparations. The aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.), the FGAL (100 µmol/kg, i.p.), the positive control (arabic gum, p.o.) and the reference drug (indomethacin, 100 µmol/kg, p.o.) were administered 30 min before the zymosan A injection. In the negative control group, animals only received the vehicle (arabic gum, p.o.) 30 min before the saline injection by intraperitoneal administration.

2.4. Statistics analysis

Data obtained from animal experiments were expressed as mean and standard error of the mean (mean $\pm$ S.E.M.). Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests. A $P < 0.05$ was considered to be significant (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

3. Results

The results depicted in Fig. 2 show that the phases and FGAL isolated from *Piptadenia stipulacea*, given 60 min before, produced an inhibition of abdominal constrictions induced by the acetic acid in mice. The control and the reference drug groups showed mean constrictions ($\pm$ S.E.M.) of $42.3 (\pm 1.21)$ and $5.2 (\pm 2.9)$, respectively. The mice treated with the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) and the FGAL (100 µmol/kg, p.o. or i.p.) showed marked inhibition of the writhing response induced by acetic acid. The measured inhibitions were 49.9% (21.3 contortions), 54.6% (19.3 contortions), 38.9% (26.0 contortions) and 64.7% (15.0 contortions), respectively.

As the intraperitoneal treatment with FGAL caused an inhibition of the writhing response induced by acetic acid higher than in the observed oral treatment, the intraperitoneal route was used in all further experiments due to the small amount of this flavonoid obtained.

In the hot plate test (Fig. 3), the animals treated with morphine (15 µmol/kg, s.c.) showed a marked increase in latency at 60 and 90 min. The ones treated with the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) showed a marked increase in latency at 120 and 150 min. The

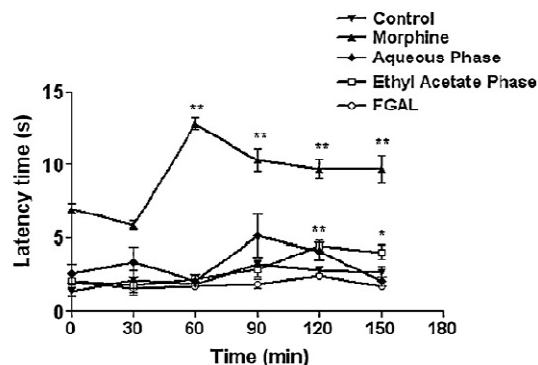


Fig. 3. Time-course of the effects of the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.), the FGAL (100 μ mol/kg, i.p.) and morphine (15 μ mol/kg, s.c.) on thermal nociception. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, * P < 0.05 and ** P < 0.01.

ones treated with the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.) and FGAL (100 μ mol/kg, i.p.) did not show any significant increase in the baseline.

The formalin test in mice revealed an antinociceptive effect (Fig. 4A and B). The ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) from *Piptadenia stipulacea* caused a significant inhibition of both neurogenic (28.5%) and inflammatory (55.7%) phases in the licking induced by the formalin. Moreover, a significant antinociceptive response was observed in the inflammatory phase of the pain induced by forma-

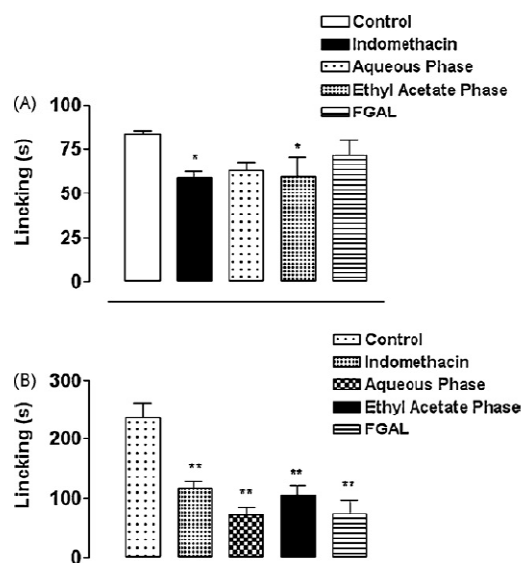


Fig. 4. Antinociceptive effect of the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.), the FGAL (100 μ mol/kg, i.p.) and indomethacin (100 μ mol/kg, p.o.), against early-phase (0–5 min, panel A) or late-phase (15–30 min, panel B) of formalin-induced nociception in mice. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, * P < 0.05 and ** P < 0.01.

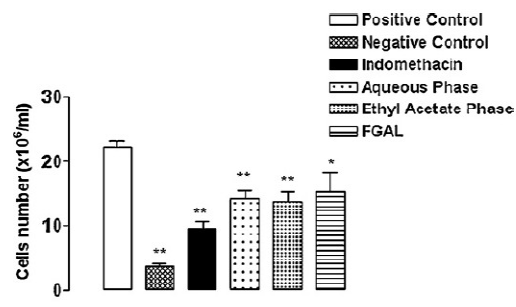


Fig. 5. Anti-inflammatory effect of the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.), the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.), the FGAL (100 μ mol/kg, i.p.) and indomethacin (100 μ mol/kg, p.o.) on zymosan-induced peritoneal inflammation test. Each point represents the mean $\pm$ S.E.M. of 6 animals. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups, * P < 0.05 and ** P < 0.01.

lin after administration of the aqueous phase (100 mg/kg, p.o.) and the FGAL (100 μ mol/kg, i.p.) by 69.4% and 68.78%, respectively. The treatment with indomethacin (100 μ mol/kg, p.o.) was also able to inhibit the second phase by 50.3%.

To determine the effects of the phases and FGAL isolated from *Piptadenia stipulacea* on peritoneal inflammation induced by zymosan, and considering the anti-inflammatory activity observed in the late-phase in the formalin test, the mice were treated with test samples. The positive control (zymosan treated) group showed an increase in the number of leukocytes in peritoneal exudates, while the negative control (saline treated) group did not show any migration of inflammatory cells. The leukocyte cell numbers up to 6 h after zymosan A injection in peritoneal exudates was reduced significantly by indomethacin (56.7%), the aqueous phase (35.8%), the ethyl acetate phase (37.7%) and FGAL (31.3%) pretreatment, when compared to exudates from the positive control group (Fig. 5).

4. Discussion

Three different animal models were used in this study to investigate the potential antinociceptive of the aqueous phase (100 mg/kg), the ethyl acetate phase (100 mg/kg) and the FGAL (100 μ mol/kg) from *Piptadenia stipulacea*. The methods for investigating antinociception were selected based on their capacity to investigate both centrally and peripherally mediated effects. The abdominal constriction induced by acetic acid and the hot plate methods investigate the peripheral and central activity, respectively, while the formalin test investigates both. Moreover, peritonitis induced by zymosan A in mice was used to evaluate the anti-inflammatory activity of the compounds.

The acetic acid-induced writhing is a visceral pain model and it is widely used to evaluate peripheral antinociceptive activity (Verma et al., 2005; Du et al., 2007). Although this test is a nonspecific model (e.g. anticholinergic, tricyclic antidepressants and antihistaminic and other agents show activity in this test), it is widely used for analgesic screening and involves local peritoneal receptors (cholinergic and histaminic receptor) and the mediators, acetylcholine and histamine (Alexandre-Moreira et al., 1999; Miranda et al., 2001). This method has been associated with prostanooids in general, e.g. increased levels of PGE₂ and PGF_{2 α} in peritoneal fluids as well as lipoxygenase products (Verma et al., 2005). The most important transmission pathways for inflammatory pain are those comprising peripheral polymodal nociceptors sensitive to protons, such as ASICs (acid sensitive ion channels) and to algogen substances, such as bradykinin and cytokines. These receptors send signals to the

central nervous system (CNS) via afferent sensory C-fibers entering the dorsal horn. In addition, it is well established that the nociceptive response caused by acetic acid is also dependent on the release of some cytokines, such as TNF- α , interleukin-1 and interleukin-8 via modulation of macrophages and mast cells localized in the peritoneal cavity (Lucena et al., 2007). In this test, our findings showed a significant decrease in the number of acetic acid-induced abdominal constrictions, by all compounds. Furthermore, the FGAL given by intraperitoneal administration seems to be more effective compared to the one given by oral administration. Thus, the flavonoid is not well absorbed by the gastrointestinal tract or was metabolized too fast by inactive products. Therefore, these protective effects in the writhing test seem less pronounced than those of dypirone used as the reference peripheral analgesic drug. In order to understand the mechanisms involved in the roles of the aqueous phase, the ethyl acetate phase and the FGAL, additional investigations are necessary to determine the relationship between treatment by the compounds and the changes in the inflammatory mediators or in the functions of peritoneal macrophages and mast cells in mice.

The hot plate test is a central model that has selectivity for opioid-derived analgesics, such as morphine. Experimental evidence obtained in this study indicates that the ethyl acetate phase (100 mg/kg, p.o.) from *Piptadenia stipulacea* delayed the reaction times of the mice significantly ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) in the hot plate nociceptive test method. Morphine (15 μ mol/kg, s.c.) also profoundly delayed the reaction times of the animals. In addition, this phase significantly ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) inhibited acetic acid-induced writhes in mice as well. These observations tend to suggest that the ethyl acetate phase may possess centrally and peripherally mediated antinociceptive properties. The peripheral antinociceptive effect of the plant extract may be mediated via inhibition of cyclooxygenases and/or lipoxygenases (and other inflammatory mediators), while the central analgesic action of the extract may be mediated through inhibition of central pain receptors or inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein (i.e. COX-3) (Ballou et al., 2000; Dou et al., 2004; Ojewole, 2006).

The formalin test is a model constituted of two distinct phases. The first transient phase is caused by the direct effect of formalin on sensory C-fibers, and the second prolonged phase is associated with the development of an inflammatory response and the release of nociceptive mediators (Hunnskaar and Hole, 1987; Shibata et al., 1989). It was reported that substance P and bradykinin participate in the appearance of the first-phase responses, and histamine, serotonin, prostaglandin and bradykinin are involved in the second-phase responses (Du et al., 2007). In the formalin test, which is sensitive to various classes of analgesic drugs (Hunnskaar and Hole, 1987), our results showed that the time spent in licking the injured paw was significantly reduced by oral administration of the ethyl acetate phase given in both phases. In addition, treatments with the aqueous phase administered intraperitoneally protected only against the second phase. In this test, the centrally acting drugs, such as narcotics, inhibit both phases equally, while peripherally acting drugs, such as non-steroid anti-inflammatories and corticosteroids, only inhibited the second phase (Miranda et al., 2001; El Habazi et al., 2006). In fact, the effect of the ethyl acetate phases on both phases of the formalin test showed that they contain active analgesic agents acting both centrally and peripherally.

The antinociceptive effect of the FGAL in the second phase of the formalin test indicated a probable anti-inflammatory activity for this compound. Flavonoids are also reported to be good antioxidants and antinociceptive agents, such as quercetin and myricitrin. Furthermore, much attention has been given to the relationship between the antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids, *in vitro* and *in vivo* (Nijveldt et al., 2001; Meotti et al., 2006; Willain-Filho et al., 2008). Flavonoids have been shown to inhibit cyclooxygenase, lipoxygenase, microsomal monooxygenase,

glutathione S-transferase, mitochondrial succinoxidase and NADPH-oxidase, all involved in reactive oxygen species generation (Odontuya et al., 2005). Another anti-inflammatory property of flavonoids is their suggested ability to inhibit neutrophil degranulation (Nijveldt et al., 2001). Indeed, there are studies showing that certain flavonoids, such as daidzein, genistein, isorhamnetin, kaempferol, quercetin, naringenin and pelargonidin, down-regulate NO production in response to inflammatory stimuli (Hämäläinen et al., 2007). Flavonoids exert this down-regulation of pro-inflammatory enzymes (COX-2 and iNOS) through the activation of peroxisome proliferator-activated receptor (γ) (PPAR γ), regulation of calcium homeostasis, inhibition of phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase), tyrosine kinases, NF- κ B, c-JUN, as well as modulation of several cell survival/cell-cycle genes (Sobrattee et al., 2005).

In addition, some effects of the flavonoids may be a result of a combination of radical scavenging and an interaction with enzyme functions. When reactive oxygen species are in the presence of iron, lipid peroxidation occurs. Specific flavonoids are known to chelate iron, thereby removing a causal factor for the development of free radicals. Direct inhibition of lipid peroxidation is another protective measure. Selected flavonoids can reduce complement activation, thereby decreasing the adhesion of inflammatory cells to the endothelium and in general resulting in a diminished inflammatory response (Nijveldt et al., 2001).

Flavonoids with *meta*-5,7-dihydroxy arrangements in the A ring and the 2,3-double bond, in combination with the 4-keto, such as FGAL described in this article, are strong inhibitors of COX-2 because they show important antioxidant and free radical scavenging activities. The presence of a C2–C3-double bond of the C ring appears to be a major determinant of this activity as enzyme inhibitors (Rice-Evans et al., 1997; Pascual-Teresa et al., 2004). The hydroxyl groups in positions 5 and 7 in the A ring, in combination with the 4-keto in the B ring give indications that FGAL can inhibit NADPH-oxidase (Pimentel, 2006). The carbonyl group in position 4 on the C ring also suggests a direct inhibition of lipid peroxidation through antioxidant activity of FGAL (Nijveldt et al., 2001; Pimentel, 2006). Besides, this flavonoid is a flavonol that can also act as a PPAR γ ligand, this activity being structure-dependent: the C2–C3-double bond of the C ring and the hydroxyl groups at positions 5 and 7 on the A ring are important for the activation of PPAR γ (Sobrattee et al., 2005).

To confirm the probable anti-inflammatory activity of the aqueous and the ethyl acetate phases and the FGAL from *Piptadenia stipulacea*, the peritonitis induced by zymosan A in mice test was done. Peritonitis is a frequent inflammatory condition with severe morbidity and mortality, and its infectious etiologies include bacteria, fungi and parasites. Zymosan-induced peritonitis mimics a yeast infection (zymosan is a polysaccharide component of the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*) and represents a well-characterized model for studies on acute peritoneal inflammation (Kolaczowska et al., 2008). In this test, the results demonstrated that the aqueous and ethyl acetate phases from *Piptadenia stipulacea* significantly reduced the number of recruited cells, showing that these phases contain active anti-inflammatory agents. It is well known that reactive oxygen species and proteases produced by activated polymorphonuclear neutrophils cause or exacerbate inflammatory reactions. It has been shown previously that certain prostanoids can inhibit various functions of the neutrophils. It has been suggested that inhibition by endogenously generated prostaglandins (PGs) is one of the mechanisms by which the pro-inflammatory effects of the neutrophils are limited (Oktar et al., 2004). However, FGAL was not able to inhibit the recruitment of leukocytes because it was administered intraperitoneally and, as an exogenous agent promoted cell recruitment. This flavonoid probably has an anti-inflammatory activity, which was verified

through significant inhibition of inflammatory nociception in the formalin test.

Based on the data obtained, one of the mechanisms of actions of antinociceptive activity by FGAL probably involves the inhibition of COX-2 due to its antioxidant activity by free radical scavenging, inhibition of NADPH-oxidase or activation of PPAR γ . Furthermore, this compound is probably able to inhibit lipid peroxidation too. However, further studies are necessary to find out the real mechanisms of the actions of this compound, and in fact, studies are currently underway to isolate and characterize other active principle(s).

5. Conclusions

In conclusion, this study has shown that the phases and the flavonoid (FGAL) isolated from *Piptadenia stipulacea* possess significant antinociceptive and anti-inflammatory effects in laboratory animals at the doses and routes investigated. The results support the traditional use of this plant in some painful and inflammatory conditions. However, pharmacological and chemical studies are needed in order to characterize the mechanism(s) responsible for the antinociceptive and anti-inflammatory action and also to identify other active agents present in *Piptadenia stipulacea*. Moreover, the antinociceptive and anti-inflammatory action demonstrated in the present study supports, at least in part, the ethnomedical uses of this plant.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (BR), CNPq (BR), MCT (BR), FAPEAL (BR) and IM-INOVAR (BR, #420015/05-1) for fellowship and financial support. The authors wish to thank several of their colleagues working at the Federal University of Alagoas for their constructive criticism and assistance in carrying out this project.

References

- Albuquerque, U.P., Andrade, L.H.C., 2002. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). *Interciência* 27, 336–346.
- Al Dabba, M.M., Kitahara, K., Suganuma, T., Hashimoto, F., Tadera, K., 2006. Antioxidant and α -amylase inhibitory compounds from aerial parts of *Varthema iphionoides* Boiss. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70 (9), 2178–2184.
- Alexandre-Moreira, M.S., Piuvezam, M.R., Araújo, C.C., Thomas, G., 1999. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 171–177.
- Ballou, L., Botting, R.M., Gonorha, S., Zhang, J., Vane, J.R., 2000. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10272.
- Barbosa, M.R.V., Lima, I.B., Lima, J.R., Cunha, J.P., Agra, M.F., Thomas, W.W., 2007. Vegetação e flora no Cariri Paraibano. *Oecologia Brasiliensis* 11, 313–322.
- Bezerra, D.A.C., 2008. Estudo fitoquímico bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir et *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Campina Grande, 62 pp.
- Chiappeta, A.D.A., De Mello, J.F., 1984. Higher plants with biological activity. *Plants of Pernambuco. Revista do Instituto de Antibióticos* 11, 99–111.
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 32, 295–310.
- Cunha, T.M., Dal-Secco, D., Verri-Júnior, W.A., Guerrero, A.T., Souza, G.R., Vieira, S.M., Lotufo, C.M., Neto, A.F., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2008. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. *European Journal of Pharmacology* 590, 127–135.
- Doherty, N.X., Poubelle, P., Borgeat, P., Beave, T.H., Westrich, G.L., Schrader, N.L., 1985. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E₂. *Prostaglandins* 30, 769–789.
- Dou, W., Jiao, Y., Gonorha, S., Raghow, R., Ballou, L.R., 2004. Nociception and the differential expression of cyclooxygenase-1 (COX-1), the COX-1 variant retaining intron-1 (COX-1v), and COX-2 in mouse dorsal root ganglia (DRG). *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 74, 29–43.
- Du, J., Yu, Y., Ke, Y., Wang, C., Zhu, L., Qian, Z.M., 2007. Ligustilide attenuates pain behavior induced by acetic acid or formalin. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 211–214.
- El Habbaz, K., Aboufatima, R., Benharref, A., Ziad, A., Chait, A., Dalal, A., 2006. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 406–411.
- Elsohly, H.N., El-Ferally, F.S., Joshi, A.S., Walker, L.A., 1997. Antiviral flavonoids from *Alkanna orientalis*. *Planta Medica* 63, 384.
- Fabricante, J.R., Andrade, L.A., 2007. Análise estrutural de um remanescente de caatinga no Sertão Paraibano. *Oecologia Brasiliensis* 11, 341–349.
- Florentino, A.T.N., Araújo, E.L., Albuquerque, U.P., 2007. Contribuição de quintais agroflorestais na conservação de plantas da Caatinga, Município de Caruaru, PE, Brasil. *Acta Botanica Brasiliensis* 21, 37–47.
- Fontenele, J.B., Viana, G.S.B., Xavier, Filho, J., Alencar, J.W., 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 643–646.
- Franzotti, E.M., Santos, C.V., Rodrigues, I.L.M., Mourão, R.J.I., Andrade, M.R., Antoniolli, A.R., 2000. Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *Journal of Ethnopharmacology* 72, 273–277.
- Guardia, T., Rotelli, A.E., Juárez, A.O., Pelzer, L.E., 2001. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 56, 683–687.
- Hai-Bo, L., Zhan-Li, W., Ying-Xin, Q., Jia-Ju, Z., 2007. Flavonoids with aldose reductase inhibiting activity: pharmacophore modeling and implications for mechanism. *Wuli Huaxue Xuebao* 23, 1059–1064.
- Hamalainen, M., Nieminen, K., Vuorela, P., Heinonen, M., Moilanen, E., 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit stat-1 and nf- κ b activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only nf- κ b activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation* 2007, 45673.
- Hunskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114.
- Kolaczowska, E., Arnold, B., Opdenakker, G., 2008. Gelatinase B/MMP-9 as an inflammatory marker enzyme in mouse zymosan peritonitis: comparison of phase-specific and cell-specific production by mast cells, macrophages and neutrophils. *Immunobiology* 213, 109–124.
- Kolaczowska, E., Seljelid, R., Plytycz, B., 2001. Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 33–42.
- Koster, R., Anderson, M., De-Beer, E.J., 1959. Acetic acid analgesic screen. *Federation Proceedings* 18, 418–420.
- Leach, D., Stevenson, L., Gabriel, B., Beattie, K., 2007. Biologically active compounds isolated from *Centipeda* and their biological activity as antioxidant and anti-inflammatory agents. *PCT Patent Filing*, p. 49.
- Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology* 147, S232–S240.
- Lucena, G.M.R.S., Gadotti, V.M., Maffi, L.C., Silva, G.S., Azevedo, M.S., Santos, A.R.S., 2007. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 19–25.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435.
- Mecuti, F.C., Luiz, A.P., Pizzolatti, M.G., Kassuya, C.A.L., Calixto, J.B., Santos, A.R.S., 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316, 789–796.
- Miranda, F.G.G., Vilar, J.C., Alves, I.A.N., Cavalcanti, S.C.H., Antoniolli, A.R., 2001. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Iatrobeua avellaneda* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacology* 1, 1–16.
- Morikawa, T., Abdel-Halim, O.B., Matsuda, H., Ando, S., Muraoka, O., Yoshikawa, M., 2006. Pseudoguaiane-type sesquiterpenes and inhibitors on nitric oxide production from *Dichrocephala integrifolia*. *Tetrahedron* 62, 6435–6442.
- Nijveldt, R.J., Van-Nood, E., Van-Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., Van-Norren, K., Van-Leeuwen, P.A.M., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418–425.
- Odontuya, G., Hoult, J.R.S., Houghton, P.J., 2005. Structure-activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytotherapy Research* 19, 782–786.
- Ojewole, J.A.O., 2006. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fisch. and C.A. Mey. (Hypoxidaceae) corm [‘African Potato’] aqueous extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 103, 126–134.
- Oktar, B.K., Yuksel, M., Alican, I., 2004. The role of cyclooxygenase inhibition in the effect of a-melanocyte-stimulating hormone on reactive oxygen species production by rat peritoneal neutrophils. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 71, 1–5.
- Pascual-Teresa, S., Johnston, K.L., Dupont, M.S., O’Leary, K.A., Needs, P.W., Morgan, L.M., Clifford, M.N., Bao, Y., Williamson, G., 2004. Quercetin metabolites down-regulate cyclooxygenase-2 transcription in human lymphocytes *ex vivo* but not *in vivo*. *The Journal of Nutrition* 134, 552–557.
- Pereira, I.M., Andrade, L.A., Costa, J.R.M., Dias, J.M., 2001. Regeneração natural em um remanescente de caatinga sob diferentes níveis de perturbação, no agreste paraibano. *Acta Botanica Brasiliensis* 15, 413–426.
- Pimentel, F.O., 2006. Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica [dissertation], Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Rao, Y.R., Fang, S.H., Tzeng, Y.M., 2005. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 249–253.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152–159.
- Rosenbloom, R.A., 2003. Flavonoid compositions for the treatment of skin disorders. Patent Application Publication, p. 11.
- Rosenbloom, R.A., 2004. Methods using antioxidant flavonoid compounds for the treatment of peripheral neural and vascular ailments. Patent Application Publication, p. 11.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inuki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 38, 347–352.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., Bahorun, T., 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutation Research* 579, 200–213.
- Tjølsen, A., Berger, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.H., Hole, K., 1992. The formalin test: evaluation of the method. *Pain* 51, 5–17.
- Verma, P.R., Joharapurkar, A.A., Chatpalliwar, V.A., Asnani, A.J., 2005. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 298–301.
- Verri-Júnior, W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology and Therapeutics* 112, 116–138.
- Vodovotz, Y., Csete, M., Bartels, J., Chang, S., An, G., 2008. Translational systems biology of inflammation. *PLoS Computational Biology* 4, e1000014 (advance online publication).
- Weiss, U., 2008. Inflammation. *Nature* 454, 427.
- Willain-Filho, A., Cechinel-Filho, V., Olinger, L., Souza, M.M., 2008. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Archives of Pharmacological Research* 31, 713–721.
- Willaman, J.J., Li, H.L., 1970. Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids, 1957–1968 (continued from a2230). *Lloydia* 335 (1), 1–286.
- Yonathan, M., Asres, K., Assefa, A., Bucar, F., 2006. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Cheilanthes farinose*. *Journal of Ethnopharmacology* 108, 462–470.