



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

**Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da
casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)**

Maceió – AL
2010

ANANSA BEZERRA DE AQUINO

Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Alagoas – Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior
Co-orientadora: Prof.^aDr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira

Maceió - AL
2010

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

Bibliotecária Responsável: Janaina Xisto de Barros Lima

- A657a Aquino, Anansa Bezerra de.
Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae) /Anansa Bezerra de Aquino, 2010.
88 f. : il.
- Orientador: João Xavier de Araújo Júnior.
Co-Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2010.
- Bibliografia: f. 79-89.
1. Produtos naturais. 2. *Aspidosperma tomentosum*. 3. Atividade antinociceptiva. 4. Atividade antiinflamatória. I. Título.

CDU: 615:576



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

Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Anansa Bezerra de Aquino, intitulado: "Avaliação do perfil antiinflamatório e antinociceptivo da espécie *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae)", orientado pelo Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 12 de março de 2010.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato APROVADO

Banca Examinadora:

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

Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira -(ICBS-UFAL)

Profa. Dra. Elita Scio Fontes (UFJF)

Dedico este trabalho a minha filha, que tem mudado cada passo da minha vida. Que tem mostrado que o amor não tem limites, e que me dá força para nunca desistir.

AGRADECIMENTOS

A Deus. Ele nos guia e nos dá a força que precisamos para enfrentar os obstáculos e realizarmos nossos sonhos.

Aos meus pais por todo apoio e amor. Por acreditarem em mim em todo momento. Por toda confiança e por estarem juntos a mim a todo o momento.

A minha irmã Alana por todo carinho, alegria e amizade. Amor verdadeiro e incondicional.

A minha irmã Carol e meu cunhado Marcio que mesmo longe estão bem perto sempre torcendo por mim.

Ao Roosevelt por mostrar que a distância não apaga o amor verdadeiro. O amor supera, espera e que está acima de tudo.

Ao meu orientador João Xavier pela orientação e a oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A minha co-orientadora Magna Suzana, pela oportunidade, confiança, pela minha formação e acima de tudo pelas palavras ditas e exemplos que vão ser lembrados por toda minha vida pessoal e profissional.

A minha amiga Iara por toda atenção e por está sempre presente. Pelos momentos de distração, pelas conversas, pelas palavras. Por todo carinho.

A minha amiga Wanessa, pra sempre chefe. Por todos os momentos de alegria, diversão. Por toda amizade sincera.

Aos meus amigos Yolanda, Gabriela, Everton, Diogo, Thays e Aline. Por acreditarem, por toda ajuda, pelos experimentos, ensinamentos. Por estarmos presentes na vida uns

dos outros a tanto tempo e mesmo com todas nossas diferenças entendemos e nos aceitamos.

A todos do LaFI: Eliane, Carol, Luiz, Anne, Walfrido, Mariana, Angélica, Débora, Morgana, Amuzza. Por todos nós juntos fazermos do LaFi uma família.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, onde foi realizada toda a parte química.

Ao Willians Epifânio e Manuele Prestrelo, pela ajuda direta nesse trabalho. Aos amigos do LPqPrN.

Aos meus amigos da faculdade, cada um seguiu um caminho diferente, mas mesmo sem o contato de todo dia, estão sempre presentes na lembrança.

Aos professores do programa de Pós- Graduação.

Aos alunos da minha turma de mestrado Ana Dalva, Daniele, Krystianelli, Guacira, Sônia, Diogo, Raquel, Rafael, Gustavo, Alex e os demais do curso de Pós-graduação

A Capes e Fapeal pelo apoio financeiro.

Aos amigos e funcionários do ICBS.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

A todos, muito obrigada.

Vinde a mim, todos os que estais cansados e sobrecarregados, e eu vos aliviarei. Tomai sobre vós o meu jugo e aprendei de mim, porque sou manso e humilde de coração; e achareis descanso para a vossa alma. Porque o meu jugo é suave, e meu fardo é leve."

(Mateus 11:28-30)

RESUMO

No presente trabalho foram avaliadas as atividades antinociceptiva e antiinflamatória da casca do caule da espécie *Aspidosperma tomentosum*, em modelos de dor e inflamação induzidas em camundongos. A *A. tomentosum* pertence à família Apocynaceae que vem sendo extensivamente estudada e caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de alcaloides, alguns de importância terapêutica, como vimblastina e vincristina. A espécie é conhecida como pau-pereiro do campo e foi coletada no cerrado brasileiro, na cidade de Planaltina no estado de Goiás, em maio de 2004. Foram avaliados as atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico bruto, obtido por extração com 20 L de etanol 90%, das frações, obtidas por cromatografia rápida em funil de separação adaptado, com solventes segundo um gradiente crescente de polaridade, e do flavonoide isorramnetina, obtido na filtração do extrato etanólico bruto de casca do caule da espécie *A. tomentosum*. Foram realizados os seguintes testes: teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente, formalina, edema de orelha induzido por capsaicina, peritonite induzida por tioglicolato a 3%. Foi também avaliada alteração motora e/ou depressão do sistema nervoso central pelo ensaio de catalepsia. Para a análise estatística utilizou-se ANOVA seguida do teste Dunnet, no tutorial Prisma®. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, o extrato etanólico e frações apresentaram uma taxa de inibição entre 50,8% a 59,7%, comparados com a dipirona. No ensaio de placa quente, as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5% apresentaram aumento no tempo de latência do animal na placa quente, sendo esse resultado revertido na presença da naloxona. No ensaio de nocicepção induzida por formalina, o extrato etanólico bruto e suas frações apresentaram resultados significativos nas duas fases do ensaio, quando comparados ao controle, sendo a fração CHCl₃ 100% com melhor desempenho nas duas fases (tempo de latência médio de 61s e 75s na primeira e segunda fase, respectivamente). No teste de edema de orelha induzida por capsaicina apenas a fração solúvel do extrato etanólico bruto, a fração CHCl₃:MeOH 10% e a isorramnetina não apresentaram inibição do edema, onde o CHCl₃:AcOEt 50% foi o mais ativo (64,2% de inibição do edema). No ensaio de peritonite o extrato etanólico bruto, a isorramnetina e as frações utilizadas inibiram a migração celular, exceto a fração AcOEt 100%. O resultado do ensaio de catalepsia sugere que o tratamento com as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5% obtidas da espécie *A. tomentosum* não alteram a capacidade motora do animal. Os resultados observados neste estudo indicam que espécie *A. tomentosum* é capaz de modular a resposta antinociceptiva e antiinflamatória aguda.

Palavras-chave: Antinocicepção, Antiinflamatório, *Aspidosperma tomentosum*.

ABSTRACT

In this study we evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the stem bark of the species *Aspidosperma tomentosum* in models of pain and inflammation induced in mice. *A. tomentosum* belongs to the family Apocynaceae that has been extensively studied and characterized chemically by the frequent occurrence of alkaloids, some of therapeutic importance, such as vinblastine and vincristine. This species is known as “pau-pereiro do campo” and was collected in the Brazilian cerrado, in the city of Planaltina the state of Goiás, in May 2004. We assessed the antinociceptive and anti-inflammatory activity of crude ethanol extract obtained by extraction with 20 L of 90% ethanol, fractions obtained by chromatography adapted, according to a solvent gradient of increasing polarity, and the flavonoid isorhamnetin, obtained in the filtration of crude ethanolic extract of stem bark of *A. tomentosum*. We conducted the following tests: test of writhing induced by acetic acid, hot plate, formalin, ear edema induced by capsaicin, peritonitis induced by thioglycollate 3%. Was also evaluated motility and / or depression of the central nervous system by the test of catalepsy. For statistical analysis we used ANOVA followed by Dunnet test, the tutorial Prisma ®. Values were considered significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. In the abdominal writhing test induced by acetic acid, ethanol extract and fractions showed higher inhibition between 50.8% to 59.7%, compared with dipyrone. In the hot plate test, the fractions Hex: CHCl₃ 50%, 100% CHCl₃ and CHCl₃: MeOH 5% showed an increase in latency of the animal on the hot plate, and this result was reversed in the presence of naloxone. In the test of nociception induced by formalin, the crude ethanol extract and its fractions presented significant results in both phases of testing, when compared to control, and the CHCl₃ 100% fraction presented better performance in both phases (average latency time of 61s and 75s the first and second phases, respectively). In the test of ear edema induced by capsaicin only the soluble fraction of crude ethanol extract, the fraction of CHCl₃: MeOH 10% and isorhamnetin showed no inhibition of edema, where the CHCl₃: AcOEt 50% was the most active (64.2% of inhibition of edema). In the trial of peritonitis the crude ethanol extract, the isorhamnetin and the fractions used inhibited cell migration, except the fraction AcOEt 100%. The test result of catalepsy suggests that treatment with the fractions Hex: CHCl₃ 50%, 100% CHCl₃ and CHCl₃: MeOH 5% of the isolated species *A. tomentosum* not alter the motor skills of the animal. The results observed in this study indicate that the species *A. tomentosum* is able to modulate the antinociceptive and anti-inflammatory response.

Keywords: Antinociception, Anti-inflammatory, *Aspidosperma tomentosum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção e ação de prostaglandinas -----	29
Figura 2 - Visão Geral do Mecanismo da Dor -----	33
Figura 3 - Efeitos Biológicos das isoformas da COX -----	36
Figura 4 - <i>Cannabis sativa</i> L. -----	40
Figura 5 - Espécie <i>Catharantus roseus</i> L. -----	45
Figura 6 - Espécie <i>Aspidosperma nitidum</i> -----	46
Figura 7 - Espécie <i>Aspidosperma tomentosum</i> – Pau-Pereiro do Campo -----	46
Figura 8 - Estruturas de Fármacos Antiinflamatórios Usados na Terapêutica -----	48
Figura 9 - Flavonóides isolados das folhas da espécie <i>Aspidosperma quebrancho-</i> <i>blanco</i> -----	49
Figura 10 - Aspecto da substância precipitada obtida após filtração a vácuo -----	51
Figura 11 - Cromatografia rápida em funil de separação adaptado -----	52
Figura 12 - Organograma de obtenção das frações, fase solúvel e isorramnetina a partir do EEB da espécie <i>A. tomentosum</i> -----	59
Figura 13 - Estrutura do flavonóide 3,5,7,4'-Tetraidroxi-3'-metoxiflavona – Isorramnetina isolado da casca do caule da espécie <i>Aspidosperma tomentosum</i> -----	59
Figura 14 - Efeito do extrato etanólico bruto, das frações e da Isorramnetina, obtidos da espécie <i>Aspidosperma tomentosum</i> , na dose de 100 mg/kg, v.o., em ensaio de peritonite induzida por tioglicolato 3%, em camundongos (n = 6-7). **P < 0,01; Teste ANOVA, seguido do teste Dunnet -----	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das espécies do gênero <i>Aspidosperma</i> -----	44
Tabela 2 - Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio contorção abdominal induzida por ácido acético -----	61
Tabela 3- Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio de placa quente-----	62
Tabela 4 – Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio de placa quente, na presença de naloxona-----	63
Tabela 5 – Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio de formalina -----	64
Tabela 6 - Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina-----	65
Tabela 7 - Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie <i>A. tomentosum</i> (v.o) no ensaio de catalepsia-----	66

LISTA DE ABREVIações

AA	Ácido Araquidônico
AcOEt	Acetato de Etila
AINE	Antiinflamatórios Não Esteroidais
ATP	Trifosfato de Adenosina
Bradicinina	BK
CHCl ₃	Clorofórmio
CHCl ₃ -AcOEt	Clorofórmio-Acetato de Etila
CHCl ₃ -MeOH	Clorofórmio-Metanol
COX	Ciclooxigenase
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
HCT-8	Linhagem de células tumorais de Glioblastoma (Tumor de SNC)
Hex	Hexano
Hex- CHCl ₃	Hexano-Clorofórmio
Histamina	H
IE	Índice de Edema
II	Índice de Inflamação
Iic	Índice de inflamação grupo controle
Iit	Índice de inflamação grupo tratado
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase

5-HT	Serotonina
MDA-MB-435	Linhagem de células tumorais de câncer de Mama humano
NO	Óxido nítrico
OC	Peso de orelha controle
OI	Peso de orelha inflamada
OMS	Organização Mundial de Saúde
PG	Prostaglandina
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Prostaglandina H2
PGI2	Prostaglandina I2
SF-295	Linhagem de células tumorais de carcinoma Ileocecal-cólon
SNC	Sistema nervoso central
Tx	Tromboxano
TxA2	Tromboxano A2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

1 Introdução -----	17
2 Objetivos -----	20
2.1 Objetivo Geral -----	21
2.2 Objetivos Específicos -----	21
3 Revisão da Literatura -----	22
3.1 Inflamação -----	23
3.1.1 Mediadores Inflamatórios -----	25
3.2. Dor -----	29
3.2.1 Modulação da dor -----	31
3.2.2 Mediadores da dor -----	33
3.3 Alvos terapêuticos para o tratamento da dor -----	35
3.4 Considerações sobre plantas medicinais -----	40
3.5 Considerações sobre <i>Aspidosperma tomentosum</i> -----	43
4 Materiais e Métodos -----	50
4.1 Coleta e identificação do material botânico -----	51
4.2 Obtenção do extrato -----	51
4.3 Filtração a vácuo do extrato etanólico bruto -----	51

4.4 Cromatografia rápida em funil de separação adaptado -----	52
4.5 Animais -----	53
4.6 Substâncias -----	53
4.7 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético -----	54
4.8 Ensaio da placa quente -----	54
4.9 Ensaio de nocicepção induzida por formalina -----	55
4.10 Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina -----	55
4.11 Ensaio de peritonite induzida por Tioglicolato 3% -----	56
4.12 Ensaio de catalepsia -----	56
4.13 Análise Estatística -----	57
5 Resultados -----	58
6 Discussão -----	67
7 Conclusões e Perspectivas-----	77
Referências -----	79

1. Introdução

A resposta inflamatória tem como principal objetivo proteger o organismo contra infecções e reparar os eventuais danos teciduais que possam ter ocorrido. Sendo assim, pode ser definida como uma resposta do sistema imune a danos celulares e teciduais causados por infecções microbianas ou estímulos nocivos de origem química ou física (HAANEN & VERMES, 1995; WEISS, 2002).

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual potencial (MERSKEY & BOGDUK, 1994). Na terapia da dor, existem duas classes principais de fármacos analgésicos. Os antiinflamatórios não esteroidais são moléculas sintéticas que possuem ações antiinflamatórias, antipiréticas e analgésicas (BORNE, 1995). Os opioides abolem diretamente a transmissão nociceptiva no Sistema Nervoso Central (SNC) (VANE, 1971; AGUIRRE-BAÑUELOS & GRANADOS-SOTO, 1999). Outra classe que vem ganhando destaque tanto na pesquisa quanto na clínica são os canabinoides.

O estudo dos mediadores envolvidos no processo inflamatório e da dor vem sendo alvo de inúmeras pesquisas nos últimos anos. Existe a necessidade de obtenção de um novo fármaco de origem natural eficaz no controle da dor e inflamação que não apresente efeitos colaterais. Assim, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância.

Por milênios os produtos medicinais de origem natural têm sido utilizados para o tratamento de diversas doenças. Embora a medicina convencional tenha superado muita dessas terapias, ressurgiu nos últimos anos um grande interesse, especialmente pela indústria farmacêutica, em examinar os recursos potenciais dos produtos naturais em busca de novos compostos biologicamente ativos (ZHANG & GHOSH, 2001).

Recentes trabalhos reforçam a idéia de que os produtos naturais compõem uma fonte importante para a descoberta de novas terapias para uso na clínica.

A espécie *Aspidosperma tomentosum* está classificada na família Apocynaceae (ENDRESS & BRUYN, 2000), uma família que vem sendo extensivamente estudada por apresentar em sua constituição química substâncias de natureza alcaloídica, dentre eles alcaloides indólicos que têm sido utilizadas com grande relevância na terapêutica contra leucemia e doença de Hodgkin (ALLEN & HOLMSTEDT, 1980; BALICK & COX, 1996).

Cascas de espécies de árvores do gênero *Aspidosperma* são utilizadas na Amazônia como fonte de madeira e contra febre e reumatismo (SCHULTES & RAFFAUF, 1990; PEREZ-ARBELAEZ, 1994). Casca do caule, dentre outras partes da planta *A. tomentosum*, apresentou atividade em ensaio citotóxico *in vitro* contra o câncer de linhagens de células tumorais (MESQUITA *et al.*, 2009).

Esse trabalho tem como objetivo a busca por compostos bioativos da espécie *A. tomentosum* como protótipos de fármacos antiinflamatórios e analgésicos oriundos de plantas.

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo o estudo farmacológico da casca do caule da espécie *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos da espécie *Aspidosperma tomentosum*;
- Avaliar a atividade farmacológica do extrato etanólico bruto, frações e isorramnetina, obtidos da *Aspidosperma tomentosum*, sobre modelos murinos de nocicepção e inflamação;
- Propor as vias envolvidas no mecanismo de ação do extrato etanólico bruto, das frações e da isorramnetina.

3. Revisão da Literatura

3.1 Inflamação

O processo inflamatório é uma resposta de defesa do organismo frente a um estímulo lesivo, que visa preservar e restabelecer a homeostase do tecido agredido. Para enfrentar a injúria ou invasão por microrganismos causadores de doenças, o corpo humano possui um arsenal de respostas de defesa, e a resposta inflamatória/imunológica forma um componente significativo de muitas doenças encontradas na clínica (RANG *et al.*, 2007).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos (p.ex., agentes infecciosos, isquemia, reações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou outra lesão por agentes físicos) (MORROW & ROBERTS II, 2007). Desde Celsus que se caracteriza a inflamação por sinais “cardinais”: rubor, calor, tumor e dor. Virchow, no século XIX, acrescentou um quinto sinal: a perda da função (MONTENEGRO & FRANCO, 1999).

A inflamação é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite reumatóide, psoríase e doença inflamatória intestinal; componente importante dos danos causados por doenças auto-imunes e um contributo fundamental para doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares (LUCAS, ROTHWELL & GIBSON, 2006).

Processos inflamatórios são necessários para a vigilância imune, reparo ideal, e regeneração após a lesão (VODOVOTZ *et al.*, 2008). Por estas características a resposta inflamatória é benéfica e a sua ausência pode colocar em risco a vida do indivíduo. Embora a inflamação seja um mecanismo de defesa, os eventos complexos e mediadores envolvidos na reação inflamatória podem induzir, manter e agravar muitos

transtornos. Assim o emprego de agentes antiinflamatórios pode ser útil no tratamento dessas patologias associadas à reações inflamatórias (SOSA *et al.*, 2002).

Os fenômenos vasculares associados à resposta inflamatória têm como função a eliminação de substâncias tóxicas geradas no local, além de facilitar a chegada de células inflamatórias que, atraídas pelos mediadores quimiotáticos, fagocitam (neutrófilos e macrófagos) e/ou liberam substâncias citotóxicas, presentes em grânulos, contribuindo para a destruição do agente lesivo (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

Dependendo de sua duração, as inflamações são divididas em agudas e crônicas. A inflamação aguda tem duração relativamente curta, durando alguns minutos, horas ou dias e é independente da natureza do agente agressor (SIQUEIRA-JÚNIOR & DANTAS, 2000), enquanto que a inflamação crônica tem duração mais longa, podendo persistir por semanas e meses, na qual a inflamação ativa, destruição tecidual e as tentativas de reparo estão ocorrendo simultaneamente. Embora possa proceder à inflamação aguda, frequentemente a inflamação crônica começa de maneira insidiosa e muitas vezes com ausência dos sinais cardinais da inflamação (CONTRAN, KUNAR & COLLINS, 2000).

Do ponto de vista funcional e morfológico, as inflamações agudas se caracterizam pelo predomínio daquilo que chamamos de fenômenos exsudativos, ou seja, conseqüentes a alterações da permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo na região inflamada de líquido (edema), fibrina (que se forma no interstício pela interação entre componentes do plasma e fatores dos tecidos), leucócitos, especialmente neutrófilos e hemácias. Nas inflamações crônicas, além desses elementos, ocorrem no local, fenômenos produtivos como a proliferação de fibroblastos (com conseqüente

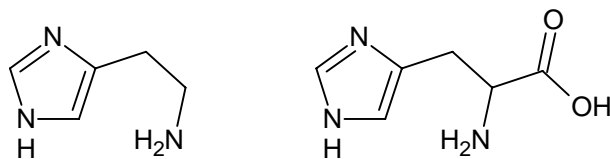
deposição de colágeno) além da migração e proliferação local de monócitos e linfócitos (MONTENEGRO & FRANCO, 1999).

3.1.1 Mediadores Inflamatórios

Durante os eventos vasculares são produzidos mediadores a partir do plasma e das células, os quais por sua vez, modificam e regulam os eventos celulares (RANG *et al.*, 2007). Após uma lesão celular, diferentes mediadores são formados ou liberados de grânulos de armazenamento (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

O processo inflamatório aciona o recrutamento de leucócitos e de indução ou ativação de mediadores inflamatórios, como cininas, os produtos da ciclooxigenase (COX) e citocinas. Muitas dessas moléculas são produzidas localmente e têm comprovada participação na inflamação do tecido, e são alvos, portanto, fundamentais para a intervenção terapêutica em uma série de doenças (LUCAS, ROTHWELL & GIBSON, 2006; MEDZHITOV, 2008).

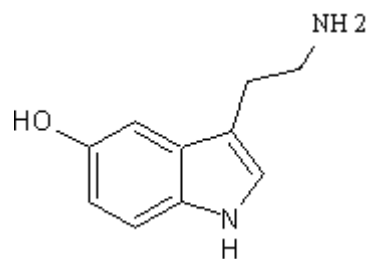
A histamina (H) (1), uma amina formada a partir do aminoácido histidina (2), é encontrada na maioria dos tecidos do corpo. Em nível celular, é encontrada, em grande parte, em mastócitos e basófilos associada à heparina, entretanto a H não mastocitária ocorre em “histaminócitos” no estômago e em neurônios histaminérgicos no cérebro (RANG *et al.*, 2007). Após sua liberação, atua em receptores histamínicos H1. Baixas concentrações produzem prurido e em altas concentrações dor. Hiperalgisia e outros efeitos pró-inflamatórios são efeitos resultantes da liberação de H (DRAY, 1995).



(1) Histamina

(2) Histidina

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) (3) é sintetizada a partir do aminoácido triptofano. É concentrada e armazenada no interior de vesículas localizadas nos axônios, corpos celulares e dendritos. As múltiplas ações da 5-HT podem estar explicadas com mais de um subtipo de receptor, que são expressos em padrões distintos, porém frequentemente superpostos. A 5-HT não é sintetizada nas plaquetas, porém é captada a partir da circulação e armazenada em grânulos secretores (SANDERS-BUSH & MAYER, 2007). A 5-HT provoca agregação plaquetária através de receptores 5-HT_{2A}, e as plaquetas que ficam retidas no vaso liberam mais 5-HT. Se o endotélio estiver intacto, a liberação de 5-HT causa vasodilatação, ajudando a manter o fluxo sanguíneo. Caso haja lesão no endotélio, a 5-HT provoca constrição e prejudica ainda mais o fluxo sanguíneo (RANG *et al.*, 2007).



(3) Serotonina

As cininas, incluindo bradicinina e calidina são peptídeos produzidos em regiões de tecido inflamado, onde induzem seus efeitos agindo em receptores B₁ e B₂. Em outros locais, suas ações incluem vasodilatação, permeabilidade vascular e estimulação de células do sistema imunológico e neurônios sensoriais. A BK é um dos mais importantes produtos de uma série de processos patofisiológicos que ocorrem em seguida de um processo de injúria tecidual (WALKER, PERKINS & DRAY, 1995). É

conhecida como um dos mais potentes agentes algésicos endógenos e pró-inflamatórios, porém de ação curta por sofrer uma rápida inativação enzimática (BOURA & SVOLMANIS, 1984; WALKER, PERKINS & DRAY, 1995).

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório, que é produzido pela isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS). Em condições patológicas, os macrófagos podem aumentar significativamente a produção de NO. Assim, a inibição da atividade da iNOs e/ou sua expressão, são importantes propriedades anti-inflamatórias (ALBERT *et al.*, 2002). Além de promover relaxamento da musculatura lisa, o NO desempenha ações pró-inflamatórias: reduz agregação plaquetária, atua como radical livre causando citotoxicidade e aumenta a produção de prostaglandinas (PG) (ROBBINS, CONTRAN & KUNAR, 2000).

A substância P é considerada um dos neuropeptídeos mais importantes e é liberada por neurônios na medula espinhal sob vários estímulos nocivos. Acredita-se que exerça sua ação através de modulação específica dos receptores NK1 (SNIJDELAAR, DIRKSEN & SLAPPENDEL, 2000). A substância P interage com outros componentes da transmissão da nocicepção, podendo aumentar as respostas excitatórias dos aminoácidos aspartato e glutamato no corno dorsal da medula espinhal (URBAN & NAGY, 1998).

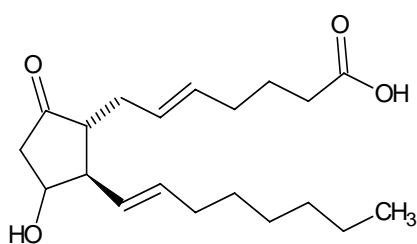
Inflamação em qualquer parte do organismo causa um rápido, extenso e duradouro aumento nos níveis do mediador inflamatório interleucina (IL) 1 β no fluido cerebrospinal, e o bloqueio do receptor de IL-1 β nas células do cérebro resulta em forte inibição da hipersensibilidade à dor (SAMAD *et al.*, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias IL1 β e TNF- α participam das reações inflamatórias agudas e crônicas. Estas citocinas atuam sobre as células endoteliais

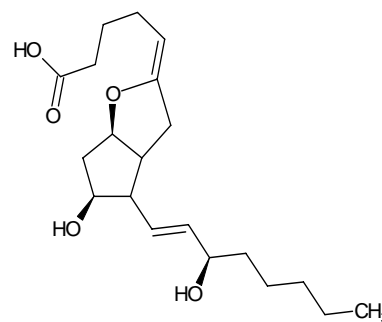
vasculares causando aumento da permeabilidade e expressão das moléculas de adesão (RANG *et al.*, 2007).

Muitos dos agentes inflamatórios importantes atuam ao interferir na síntese de eicosanoides. Os eicosanoides são produzidos a partir de fosfolipídios e estão envolvidos em vários processos fisiológicos (Fig. 1). Estão entre os mais importantes mediadores e moduladores da reação inflamatória (GUYTON & HALL, 2002; RANG *et al.*, 2007). Os eicosanoides são produzidos a partir do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo insaturado que se encontra esterificado no fosfolipídeos.

A enzima fosfolipase A2 libera o AA dos fosfolipídeos; o AA é o substrato da enzima COX que gera a Prostaglandina H2 (PGH2). Este é o precursor de uma variedade de derivados, entre eles Prostaglandina D2 (PGD2), Prostaglandina E2 (PGE2), Tromboxano A2 (TxA2) e Prostaglandina I2 (PGI2). A PGE2 (4) e PGI2 (5) tornam as terminações nervosas hipersensitivas e promovem a resposta inflamatória e a febre. A TxA2 ativa plaquetas, contribuindo para o processo de coagulação sanguínea (BAZAN & FLOWER, 2002).



(4) PGE2



(5) PGI2

Até 1971, somente uma COX era conhecida. Só no início da década de 90 a isoforma COX-2 foi descoberta (XIE *et al.*, 1991). A enzima COX-1 é expressa constitutivamente em diversos tecidos. A COX-2 geralmente é expressa sob circunstâncias específicas, principalmente como resultado da inflamação (MARCHESELLI & BAZAN, 1996). Uma década depois da descoberta da COX-2,

uma terceira isoforma foi descoberta e chamada de COX-3, sendo esta mais abundante no coração e córtex cerebral (CHANDRASERKHARAN *et al.*, 2002).

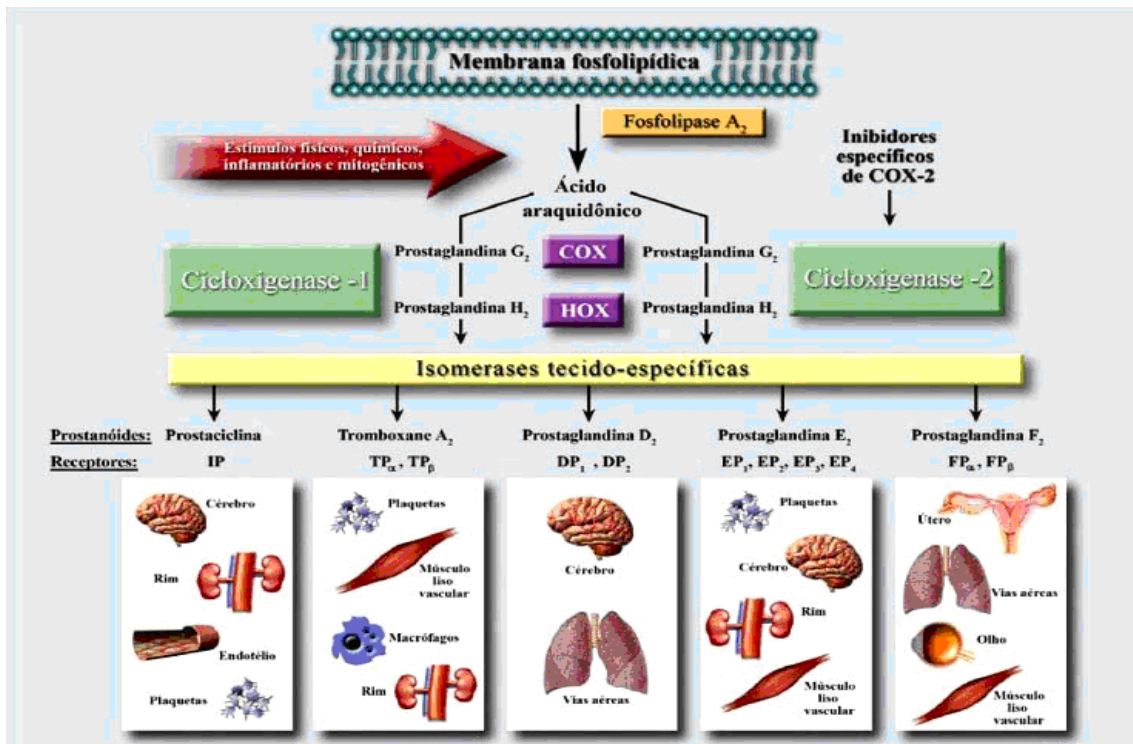


Figura 1 - Produção e ação de prostaglandinas. (Fonte: www.scielo.br/img/revistas/abc/v85n3/26011f1.jpg/14/01/2010).

3.2 Dor

O tratamento da dor aguda é um grande desafio mundial. A dor crônica afeta um número estimado de 20% dos adultos, subindo para 50% da população de idade mais avançada (VERHAAK *et al.*, 1998; CROMBIE *et al.*, 1999; BLYTH *et al.*, 2001; HARSTALL & OSPINA, 2003).

A dor é uma sensação desagradável e subjetiva resultante de um estímulo sensorial nocivo que alerta o corpo sobre um dano corrente ou potencial aos seus órgãos e tecidos (RUOFF & LEMA, 2003). Pode ser provocada por múltiplos estímulos. Estes são classificados como estímulos dolorosos mecânicos, térmicos e químicos. Em geral a dor rápida é provocada pelos tipos de estímulos mecânicos e térmicos, enquanto que a dor lenta pode ser provocada pelos três tipos (GUYTON & HALL, 2002).

A dor crônica difere da dor aguda em vários aspectos, incluindo sua duração e principalmente aos mecanismos envolvidos na sua gênese. A dor crônica pode não decorrer de uma injúria ou processo inflamatório facilmente identificável (WANG & WANG, 2003).

A dor aguda geralmente está relacionada com uma lesão recente, ativação de nociceptores no local da lesão, e pode desaparecer antes da cura do dano tecidual (CARR & GOUDAS, 1999). A dor crônica ocorre devido a uma lesão ou agravo, e pode permanecer por meses ou anos, podendo acarretar consequências físicas, comportamentais e psicológicas (LOESER & MELZACK, 1999).

A percepção da dor é classificada em duas medidas diferentes: um elemento sensorial/discriminativo e um elemento afetivo/emocional. O elemento sensorial/discriminativo reflete a percepção da informação sensorial nociva e permite ativação de receptores, a transmissão e interpretação do estímulo nocivo. O elemento afetivo/emocional corresponde à percepção do estímulo doloroso, que é seguido pela reação da dor. Reflete aspectos cognitivos e emocionais da dor, variando de um indivíduo a outro e depende de fatores individuais como idiosincrasia, experiência dolorosa anterior e conhecimento de seu significado (RAMADABRAN & BANSINATHI, 1996; CRAIG & STITZEL, 2005).

Os receptores da dor estão espalhados nas camadas superficiais da pele, bem como em certos tecidos internos como periósteo, paredes arteriais e superfícies articulares. Em contraste com os receptores da maioria dos tecidos, os receptores da dor se adaptam muito pouco e, às vezes, não se adaptam de todo. Algumas das substâncias químicas envolvidas no processo de nocicepção incluem a BK, 5-HT, H, íons potássio, ácidos, acetilcolina e enzimas proteolíticas (GUYTON & HALL, 2002).

Todos os membros do corpo são providos com terminações nervosas sensoriais que podem detectar toque, calor e dor aguda - sensações que são rapidamente transmitidas ao cérebro pelos nervos aferentes (BARTFAI, 2001).

A dor é basicamente classificada em dor nociceptiva, neuropática e inflamatória. A dor nociceptiva ocorre por estimulação química ou física das terminações nervosas normais, podendo ser resultado de danos teciduais como inflamações, traumas, manobras invasivas ou isquemias (RANG *et al.*, 2007).

A dor neuropática se refere à dor resultante de um dano (devido à injúria ou doenças) ao sistema nervoso incluindo nervos, medula espinhal e certas regiões do SNC. Pacientes com dor neuropática sofrem de dor espontânea, alodinia (dor em resposta a estímulo normalmente inócuo) e hiperalgesia (percepção acentuada de dor em resposta a um estímulo nocivo) (WANG & WANG, 2003).

A dor inflamatória é caracterizada pela presença de mediadores químicos que podem atuar diminuindo o limiar dos nociceptores, ativando os receptores ou ambos, dependendo do tipo de substância liberada (FERREIRA, LORENZETI & POOLE, 1993).

3.2.1 Modulação da dor

As terminações nervosas periféricas das fibras nociceptoras sensoriais viscerais e somáticas aferentes respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Os canais iônicos/receptores altamente especializados sofrem mudanças na sua conformação em resposta a um ou mais desses estímulos e, portanto, mediam à despolarização, necessária para iniciar um potencial de ação. Os axônios aferentes primários conduzem a informação das terminações periféricas para o SNC (GOLAN *et al.*, 2009).

Os nociceptores são continuidade de fibras aferentes sensitivas, principalmente dos tipos A- δ e C, diferenciadas pelo diâmetro e estrutura de seus axônios (MILLAN, 1999; BROOKS & TRACY, 2005). As fibras A- δ conduzem com velocidade intermediária e respondem a estímulos de frio, calor e mecânicos de alta intensidade, e possuem uma fina camada de mielina. As fibras C são mais delgadas, amielínicas e conduzem baixas velocidades. Conduzem lentamente, fazem sinal sinapse na medula e são capazes de produzir potenciais de ação em resposta ao calor, temperatura morna, estímulos mecânicos intensos ou irritantes químicos. As fibras A- δ e C terminam nas lâminas mais superficiais do corno dorsal (MILLAN, 1999; BROOKS & TRACY, 2005; GOLAN *et al.*, 2009).

Com a ativação do estímulo nocivo, as fibras A- δ dão início à fase primária da dor e, com a continuação dos estímulos, as fibras C se encarregam da segunda fase da dor (MILLAN, 1999).

Os potenciais de ação gerados nos aferentes primários induzem a liberação de neurotransmissores ao alcançarem suas terminações axônicas centrais no corno dorsal da medula espinhal (Fig. 2). A transmissão sináptica no corno dorsal, entre os aferentes primários das fibras C e os neurônios de projeção secundários, possui componentes rápidos, como o glutamato, e lentos, como neuropeptídeos (substância P e peptídeo relacionado com o gen da calcitonina) e neuromoduladores (GOLAN *et al.*, 2009).

A transmissão sináptica na medula espinhal é regulada pelas ações interneurônios inibitórios locais e as projeções que descem do tronco encefálico para o corno dorsal. Os principais neurotransmissores inibitórios do corno dorsal da medula espinhal são os peptídeos opioides, norepinefrina, 5-HT, glicina e o GABA. Como esses sistemas podem limitar a transferência da informação sensorial para o cérebro, eles representam um importante local de intervenção farmacológica (GOLAN *et al.*, 2009).

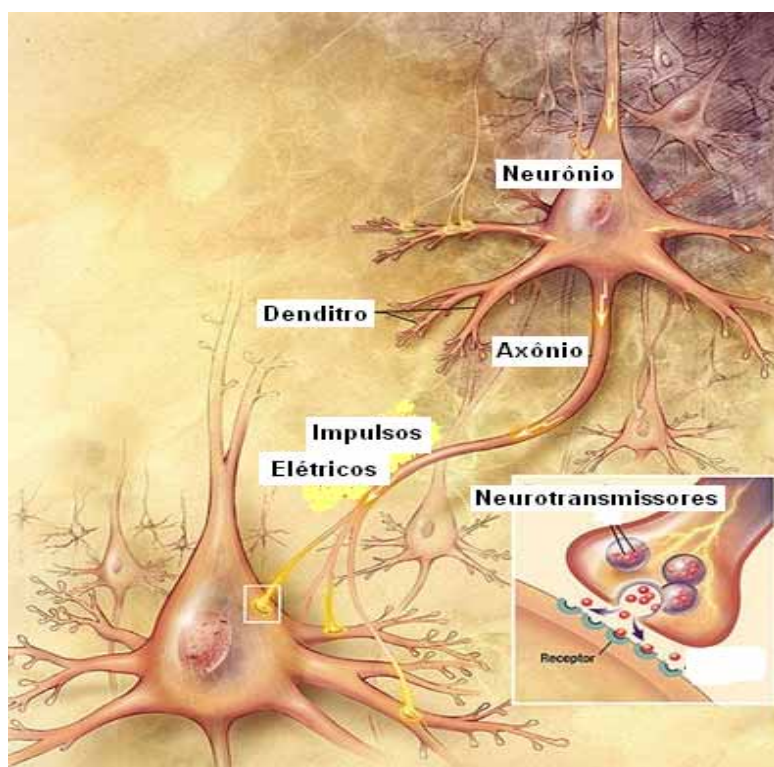


Figura 2 – Visão Geral do Mecanismo da Dor. (Fonte: www.papodehomem.com.br/we-are-all-on-drugs/15/02/2010)

3.2.3 Mediadores da dor

Quando um tecido é injuriado, frequentemente ocorre em resposta à gênese da inflamação, resultando nos aspectos gerais da enfermidade, sintomas como: febre, letargia, anorexia e dor generalizada em músculos e em articulações, e uma acentuada hipersensibilidade à dor nas proximidades do local lesionado (NETO, 2004).

Mediadores químicos estão envolvidos, dentre eles a IL-1 β . A IL-1 β é produzida no tecido inflamado, podendo ser liberada para a corrente sanguínea, sem alcançar o cérebro devido ao bloqueio da barreira hematoencefálica. As células que fazem parte da barreira hematoencefálica possuem, em sua superfície, receptores que reconhecem IL-1 β . Estas células quando estimuladas por IL-1 β expressam duas enzimas: COX-2 e PGE2 sintase (EK *et al.*, 2001).

A COX-2 converte o AA em PGH₂, e a PGE₂ sintase converte H₂ em PGE₂, um forte sinalizador de inflamação, febre e dor. A E₂ pode ativar seus receptores presentes em neurônios e células da microglia, assim transmitindo a inflamação de um tecido injuriado para o cérebro. Quando a PGE₂ se liga aos receptores de PG EP₁ e EP₃, presente nos neurônios, ocorre um aumento da excitabilidade neuronal, de forma que um estímulo normalmente inócuo torna-se doloroso (BARTIFAI, 2001).

Algumas substâncias químicas surgem no processo de nocicepção decorrentes do processo inflamatório. Algumas de produção local como a BK, 5-HT, H, produtos derivados do AA. Outras são produzidas no corpo neuronal para a periferia como a substância P e o CGRP (MARQUES, 2004).

As PGs e a substância P acentuam a sensibilidade das terminações da dor, mas não as excitam diretamente. As substâncias químicas são especialmente importantes na estimulação da dor lenta, sofrida, que ocorre após lesão tecidual. Em certas situações, a excitação das fibras torna-se progressivamente maior, especialmente na dor lenta e nauseosa, à medida que o estímulo doloroso continua (GUYTON & HALL, 2002).

O Trifosfato de Adenosina (ATP) é um componente celular presente normalmente em concentração milimolar. Todavia, em presença de uma lesão tecidual, grandes quantidades de ATP são liberadas na vizinhança das terminações nervosas, ativando-as e contribuindo para o surgimento da dor transitente (BEAN, 1990).

A substância P e o CGRP contribuem para o aumento do edema, atuando diretamente sobre as vênulas para produzir vasodilatação. Também contribuem para a liberação de H dos mastócito, contribuindo para a hiperalgesia (BASBAUM & JESSELL, 2004).

A BK é um dos agentes mais ativos causadores da dor. Isto se deve por duas ações distintas: ativação direta das fibras A- δ e C e aumento da síntese e liberação de PGs (BASBAUN & JESSELL, 2004).

Essa grande quantidade de mediadores químicos leva a redução do limiar de sensibilidade e aumento de sensibilidade das terminações nervosas vizinhas. Esse processo se estende as regiões não envolvidas pelo estímulo inicial (MARQUES, 2004).

3.3 Alvos terapêuticos para o tratamento da dor

O tratamento clínico da dor se faz por meio do uso de fármacos antiinflamatórios esteroidais ou não esteroidais. Quando se faz necessária a atenção médica em casos de dor aguda, AINEs, analgésicos opioides, ou anestésicos locais podem adequadamente controlá-la. Quase todos os analgésicos correntemente utilizados foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento da dor aguda (WANG & WANG, 2003).

Os AINEs apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas para vários processos como: algesia, inflamação, pirose, profilaxia contra doenças cardiovasculares, além de publicações científicas sugerirem sua eficácia na prevenção de doenças neurológicas, como Alzheimer, e ser também uma opção na terapia para casos de câncer (KUMMER & COLEHO, 2002; SCHUG, GARRET & GILLESPIE, 2003; BRUM-JÚNIOR, 2006; ONG *et al.*, 2007).

Esse grupo de compostos são denominados agentes antiinflamatórios por agirem no processo de redução da reação inflamatória, inibindo a liberação de PGs (RANG *et al.*, 2007; MORROW & ROBERTS II, 2007). O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição do sistema enzimático COX, responsável pela síntese dos diferentes tipos de eicosanoides (PGD₂, PGE₂, PGI₂, TXA₂), que são mediadores do processo inflamatório (Fig. 3) (BRUM-JÚNIOR, 2006).

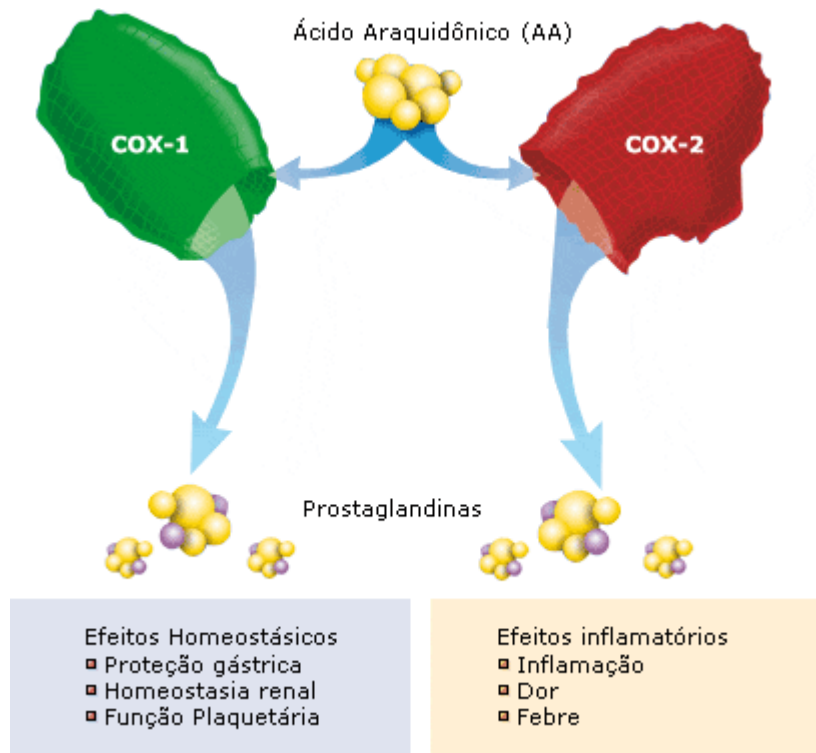


Figura 3- Efeitos Biológicos das isoformas da COX. (Fonte: www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=121885/14/01/2010)

Os representantes atualmente disponíveis inibem, em sua maioria, tanto a atividade da COX-1 (constitutiva) quanto à da COX-2 (induzida na presença de inflamação). Acredita-se que a inibição da COX-2 possa mediar, pelo menos em parte, a ação antipirética, analgésica e antiinflamatória dos AINE; entretanto a inibição da COX-1 resulta em efeitos colaterais indesejáveis, particularmente os que levam ao desenvolvimento de úlceras gástricas em decorrência da produção diminuída de PGs (MORROW & ROBERTS II, 2003).

Os AINEs afetam as vias da dor através de pelo menos três mecanismos diferentes. Em primeiro lugar, as PGs reduzem o limiar de ativação nas terminações periféricas dos neurônios nociceptores aferentes primários. Ao reduzir a síntese de PGs, os AINEs diminuem a hiperalgesia inflamatória. Em segundo lugar diminuem o recrutamento dos leucócitos e, portanto, a produção de mediadores inflamatórios derivados de leucócitos. Em terceiro lugar atravessam a barreira hematoencefálica e

impedem a geração de PGs que atuam como neuromoduladores produtores de dor no corno dorsal da medula espinal (GOLAN *et al.*, 2009).

A descoberta de opioides endógenos e dos receptores opiáceos no cérebro geraram um grande interesse quanto à compreensão do seu papel no controle endógeno da dor (STEIN, 1993).

A principal utilidade clínica dos opioides é o controle da dor. Esses fármacos são particularmente úteis no tratamento de dor viscerais difusas, dores associadas ao câncer e na analgesia pré e pós-cirúrgica. Dores neuropáticas, entretanto, costumam ser resistentes aos opioides, ao passo que dores inflamatórias ou dores somáticas de localização bem definida são mais adequadamente tratadas como analgésicos não-esteroidais ou com uma associação de um analgésico não esteroide e um opioide (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

Os opioides endógenos estão amplamente distribuídos no SNC, bem como no organismo em geral, incluindo áreas não propriamente relacionadas à dor. Os mecanismos mediados por opioides endógenos estão envolvidos numa grande variedade de processos neurais, incluindo aqueles especificamente ligados à dor (RANG *et al.*, 2007).

Existem três tipos bem definidos de receptores opioides: μ (mu), δ (delta), e κ (kappa). A ativação desses receptores desencadeia uma cascata de eventos que resultam em diversos feitos biológicos tais como: analgesia, bradicardia, depressão respiratória, depressão de reflexos flexores, euforia ou disforia, hipotermia, diurese, miose, modulação de processos endócrinos e do sistema imune, redução do peristaltismo intestinal e sedação (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

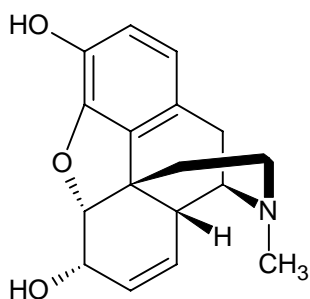
Os opioides ligam-se a receptores situados em vários núcleos e tratos do SNC e também, periféricamente, a receptores situados nas fibras sensoriais e nociceptores

periféricos. O efeito analgésico se faz através da atenuação da excitabilidade do nociceptor periférico e do neurônio aferente primário que, além de ter menor velocidade de descarga, passa a liberar menor quantidade de neurotransmissores excitatórios (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003).

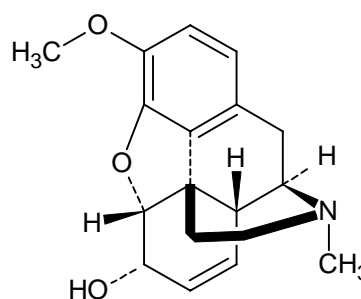
Os agonistas de receptores μ produzem analgesia espinal e supra-espinal e outros efeitos como depressão respiratória, miose, redução do trânsito intestinal e euforia (SCHOR, BOIM & SANTOS, 2003; GOLAN *et al.*, 2009). A ativação de um receptor opioide causa analgesia através de dois mecanismos básicos: redução da liberação de neurotransmissores e redução da excitabilidade neuronal.

A morfina foi o primeiro opioide (6) utilizado na terapêutica (RANG *et al.*, 2007) e juntamente com a codeína (7) e seus derivados semi-sintéticos, constituem os opioides mais amplamente utilizados para o controle da dor (GOLAN *et al.*, 2009).

Mediados pelo subtipo de receptor μ_2 , os efeitos colaterais mais importantes dos opioides é a depressão respiratória e a constipação. O uso prolongado de opioides também acarreta dependência e, a suspensão abrupta de seu uso, acarreta em síndrome de abstinência. Maiores avanços nas pesquisas de novos opioides têm objetivado o aumento da razão entre sua eficácia e seus efeitos colaterais indesejados (STEIN, SCHAFFER & MACHELSKA, 2000).



(6) Morfina



(7) Codeína

Outro mecanismo que vem ganhando destaque é aquele que envolve a participação de canabinoides endógenos e seus receptores correspondentes. A dor

severa e crônica tem sido cogitada como um possível alvo para essa terapia. (CONSROE, 1998).

Os principais alvos dos canabinoides endógenos são os receptores CB1 e CB2. Estes estão presentes em áreas de processamento de dor na medula espinhal e cérebro, e receptores CB1 estão quase exclusivamente envolvidos com efeitos antinociceptivos (RICHARDSON, ASNONSEN & HARGREAVES, 1998; CICHEWICZ, 2004). Além disso, receptores CB2, presentes em nervos periféricos também parecem contribuir para o controle da dor (CONSROE, 1998).

No SNC, os receptores CB1 são mais altamente expressos em axônios e nervos terminais. Sua expressão em células gliais é controversa e, caso ocorra, está em uma considerável densidade menor do que nos neurônios (HOWLETT *et al.*, 2002). Receptores CB2 são encontrados principalmente em células do sistema imunitário. Os níveis mais elevados de CB2 no sangue periférico são encontrados (em ordem decrescente) nos linfócitos B, células natura killer, monócitos, neutrófilos, linfócitos T8 e T4 (BOUABOULA *et al.*, 1993).

Os receptores canabinoides são parte do sistema endocanabinoide, que consiste dos receptores de canabinoides, canabinoides endógenos (endocanabinoides) e as enzimas que sintetizam e degradam endocanabinoides. Até a data, a maioria dos fármacos utilizados terapeuticamente que interagem com o sistema endocanabinoide é derivada de *Cannabis sativa* L. (Fig. 4), e produzem os seus efeitos pela ativação dos receptores canabinoides. Os cabinoides estão envolvidos em uma grande variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos (BLACK, 2004; WALTER & STELLA, 2004).

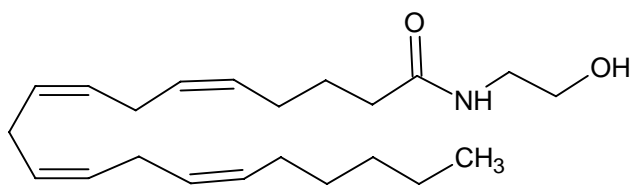
O delta-9-tetrahydrocannabinol, princípio ativo da *Cannabis sativa*, atua via receptores CB1 e CB2, já os outros canabinoides apresentam maior afinidade por um ou

outro receptor (BONFÁ, VINAGRE & FIGUEREIDO, 2008), como por exemplo, a anandamida (8), atenua a dor produzida por dano químico ao tecido cutâneo por interagir com receptores CB1 localizados fora do SNC (CALIGNANO, La RANA, GUIFFRIDA, 1998).

Lamentavelmente, a atividade psicoativa destes compostos tem impedido sua aplicação na medicina. Na última década, a elucidação dos componentes do sistema endocanabinoide uma melhor compreensão tem ampliado as possibilidades terapêuticas (BLACK, 2004; WALTER & STELLA, 2004).



Figura 4 – *Cannabis sativa* L. (Fonte: <http://quiprona.wordpress.com/2009/11/13/02/2010>)



(8) Anandamida

3.4 Considerações sobre Plantas Medicinais

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos” (WHO, 2000).

Após séculos de uso empírico, os primeiros estudos científicos de plantas medicinais datam do século XIX (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS-JÚNIOR, BOLZANI & BARREIRO, 2006).

Fitoterápico, de acordo com a portaria nº de 31 de janeiro de 1995 (BRASIL, 1995), é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefícios para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas”.

Os maiores impactos no setor de fitofármacos são confirmados nos fármacos antitumorais, onde recente prospecção revelou que 61% das 877 substâncias introduzidas como fármacos foram derivadas ou inspiradas em produtos naturais. Em certas áreas terapêuticas, estes valores sobem para 78% (antibacterianos). Com o aumento de microorganismos resistentes aos fármacos antimicrobianos já conhecidos, vários extratos de plantas medicinais foram testados, com finalidade de se procurar novas substâncias com atividade antimicrobiana reconhecida (BASTOS, 2007).

O Brasil é um dos 14 países com maior biodiversidade mundial, abrigando cerca de 13,6% de todas as espécies vegetais vivas do planeta, contendo mais de 10% de todos os organismos descritos na Terra. Essa biodiversidade ainda é pouco conhecida e muito pouco explorada quanto ao uso como fonte de medicamentos. Das plantas

floríferas conhecidas, aproximadamente 55.000 espécies, cerca de 22% destas ocorrem no Brasil, principalmente nas regiões da floresta amazônica, mata atlântica e cerrado (A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA, 2009). As florestas da região amazônica concentram grande variedade de formas de vida do planeta, sendo que apenas 30% são conhecidas da ciência, particularmente quanto as suas propriedades biomedicinais (BIODIVERSIDADE MUSEU GOELDI, 2007).

Apesar desta grande diversidade genética, o Brasil apresenta uma dependência externa, no mercado de fármacos, em que 84 % de todos os fármacos são importados e 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais (GUERRA & NODARI, 2003).

A falta de acesso ao medicamento leva a um agravamento de enfermidades, sofrimento individual e familiar, além da perda da qualidade de vida e prejuízos relacionados ao trabalho e geração de renda (LA CRUZ, 2005).

No Brasil, os estudos são focalizados em antiinflamatórios, antimicrobianos e na atividade antitumoral/citotóxica de algumas espécies de plantas (HOLETZ *et al.*, 2002; SUYENAGA *et al.*, 2002).

Um número extensivo de plantas de várias famílias encontradas no cerrado brasileiro tem sido estudado para avaliar sua eficácia e efeitos terapêuticos, além do isolamento de seus princípios ativos (NAPOLITANO *et al.*, 2003).

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).

A química de produtos naturais é, dentro da química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO *et al.*, 2002), estando as pesquisas com plantas ainda estão muito centradas no âmbito da Universidade e Institutos de Pesquisa onde se desenvolve basicamente a fitoquímica tradicional (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

3.5 Considerações sobre *Aspidosperma tomentosum*

A espécie *Aspidosperma tomentosum* está classificada taxonomicamente no gênero *Aspidosperma*, pertencente à família Apocynaceae. A família Apocynaceae foi recentemente reorganizada e inclui cerca de 1500 espécies, divididas em torno de 424 gêneros (ENDRESS & BRUYN, 2000). Essa família contém entre 3700 a 5100 espécies distribuídas em cerca de 250 a 550 gêneros (ROCHA, REIS-LUZ & RODRIGUES, 1982; NICHOLAS & BAIJNATH, 1994), sendo encontradas predominantemente nos trópicos e subtropicais e são menos frequentes em regiões temperadas (STRUWE, ALBERT & BREMER, 1994; RIBEIRO *et al.*, 1999). Na flora brasileira, são catalogadas mais de 400 espécies da família Apocynaceae, em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (CAMPBELL & HAMMOND, 1989).

A família Apocynaceae é constituída de plantas ornamentais, incluindo árvores, arbustos, ervas e plantas fornecedoras de madeira e vem sendo extensivamente estudada e apresenta algumas espécies com atividade hipotensora, simpatolítica e antimalárica (Steele *et al.*, 2002; www.mkcwb.hpg.ig.com.br/plantasmedicinais.htm).

O gênero *Aspidosperma* é encontrado apenas na América, principalmente entre o México e a Argentina (CORRÊA, 1926). Em 1987, uma nova classificação quimiotaxonômica das espécies desse gênero foi proposta por Bolzani *et al.*, compreendendo 48 espécies em 7 séries. Nessa classificação foi incluída também outra

série (Tomentosa), conforme descrito por Garcia, Ruben & Brown (1976): *A. formosanum* A. P. Duarte, *A. longepetiolatum* Kuhlm, *A. gilbertii* A. P. Duarte e *A. ramiflorum* Muell. Arg (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das espécies do gênero *Aspidosperma*.

Série	Espécies
Rígida	<i>A. rigidum</i> Rusby (= <i>A. laxiflorum</i> Kuhlm.)
Nítida	<i>A. auriculatum</i> Mgf., <i>A. carapanauba</i> M. Pichon, <i>A. compactinervium</i> Kuhlmann, <i>A. discolor</i> A. DC., <i>A. eburneum</i> F. Allem, <i>A. excelsum</i> Benth, <i>A. marcgravianum</i> Woodson, <i>A. nitidum</i> Benth ex Müll.-Arg., <i>A. oblongum</i> A. DC. E <i>A. spagazzinii</i> Molf. Ex Meyer
Quebrachines	<i>A. chakensis</i> Spegazzini e <i>A. Quebracho-blanco</i> Schlecht
Polyneura	<i>A. cuspa</i> Blake, <i>A. cylindrocarpon</i> Müell.-Arg., <i>A. dispernum</i> , <i>A. peroba</i> , <i>A. polyneuron</i> Müll.-Arg. e <i>A. sessiliflorum</i>
Pyricolla	<i>A. australe</i> Müll.-Arg., <i>A. campus-belus</i> A. P. Duarte, <i>A. gomesianum</i> A. DC., <i>A. multiflorum</i> A. DC., <i>A. nigricans</i> Handro, <i>A. olivaceum</i> Müll.-Arg., <i>A. parvifolium</i> , <i>A. populifolium</i> A. DC., <i>A. pyricollum</i> Muell.-Arg., <i>A. pyrifolium</i> Mart., <i>A. quirandy</i> , <i>A. refractum</i> Mart., <i>A. rhombeosignatum</i> , <i>A. subincanum</i> Mart., <i>A. tomentosum</i> Mart., <i>A. ulei</i> Mgf. e <i>A. vargasii</i>
Nobile	<i>A. album</i> (Vahl) R. Bent., <i>A. desmanthum</i> Benth ex Müll.-Arg., <i>A. exalatum</i> Monachino, <i>A. fendleri</i> , <i>A. limae</i> Woodson, <i>A. megalocarpon</i> Müll.-Arg., <i>A. melanocalyx</i> Müll.-Arg., <i>A. neblinae</i> Monachino, <i>A. obscurinervium</i> Azembuja, <i>A. sandwithianum</i> e <i>A. spruceanum</i> Benth
Macrocarpa	<i>A. duckei</i> , <i>A. macrocarpon</i> Mart e <i>A. Verbascifolium</i> Müll.-Arg.
Tomentosa	<i>A. formosanum</i> e <i>A. dasycarpon</i> A. DC

Várias árvores do gênero *Aspidosperma* são utilizadas no noroeste da Amazônia como fonte de madeira e contra febre e reumatismo (SCHULTES & RAFFAUF, 1990; PEREZ-ARBELAEZ, 1994).

As cascas de espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas comumente na medicina popular da Região Amazônica e a baixa toxicidade apresentada por suas infusões tem contribuído para seu uso (GOTTLIEB, KUBITZKI & MESQUITA, 1978; FERREIRA *et al.*, 2004). Cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum*, *A. polineuron* possuem atividade antimalárica comprovada por testes *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 1991).

A espécie *A. quebracho-blanco* é usada no Brasil em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento de impotência, contra sintomas de

hiperplasia prostática benigna, e dispnéia asmática e cardíaca (LYON *et al.*, 1973; AIMI *et al.*, 1991). A espécie *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA *et al.*, 2004).

A família Apocynaceae caracteriza-se quimicamente pela ocorrência frequente de substâncias de natureza alcaloídica. Os alcaloides são uma das mais variadas classes de metabólitos secundários encontrados nos organismos vivos, incluindo aproximadamente 12.000 substâncias. Alguns alcaloides obtidos de espécies de Apocynaceae apresentam importância terapêutica no tratamento de leucemia e da doença de Hodgkin, como vimblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus* L (Fig. 5) (BALICK & COX, 1996).



Figura 5- Espécie *Catharanthus roseus* L. (Fonte: www.photomazza.com/?Catharanthus-roseus/13/02/2010).

O gênero *Aspidosperma* apresenta uma ampla variedade de alcaloides indólicos (DEUTSCH *et al.*, 1994), com atividade hipotensora e simpatolítica, a espécie *A. nitidum* (Fig. 6) é utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO *et al.*, 1999), no tratamento de inflamações de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo (WENIGER *et al.*, 2001). Podemos citar também alcaloides com atividade antimalárica, como aspidospermina, extraída da espécie *A. olivaceum* (MITAINE-OFFER *et al.*, 2002).



Figura 6- Espécie *Aspidosperma nitidum*. (Fonte: www.treemail.nl/.../PlantPages/Apocynaceae.htm/13/02/2010)

Estudos relatam atividade antibacteriana da casca da espécie *A. megalocarpon* contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e atividade antiviral das partes aéreas (VERPOORTE *et al.*, 1983; ROMING *et al.*, 1992). Três alcalóides, fendlerina, aspidoalbina e aspidolimidina, que foram isolados da casca do caule dessa mesma espécie, apresentam atividade antimalárica *in vitro* (MITAINE *et al.*, 1998).

A espécie *Aspidosperma tomentosum* (Fig. 7) é encontrada no cerrado brasileiro, conhecida como Pau- Pereiro do Campo, utilizada na construção e fabricação de móveis e instrumentos musicais.

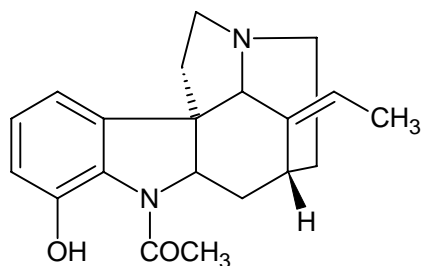


Figura 7- Espécie *Aspidosperma tomentosum* – Pau-Pereiro do Campo. (Fonte: www.arboretto.blogspot.com/2008_03_01_archive.html/13/02/2010)

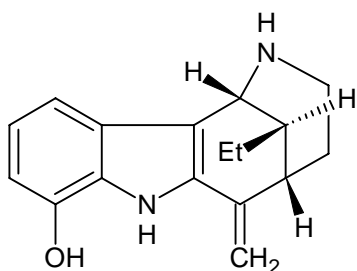
Folhas, haste de madeira, casca do caule, raiz da planta e tronco da *A. tomentosum* apresentaram atividade em ensaio citotóxico *in vitro* contra o câncer de

linhagens de células tumorais (MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295) (MESQUITA *et al.*, 2009).

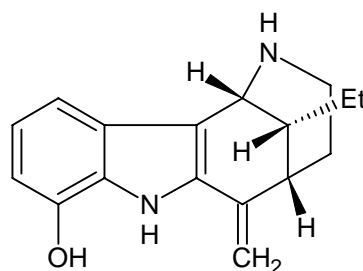
Foram isolados da espécie *A. tomentosum*, alcaloides indólicos: *N*-Acetil-12-hidroxiáspidospermatidina (limatidina) (9), (+)-Uleína (10) (ARNDT *et al.*, 1967) e 3-*epi*-Uleína (11) (BOLZANI *et al.*, 1987).



(9) *N*-Acetil-12-hidroxiáspidospermatidina (limatidina)



(10) (+)-Uleína



(11) 3-*epi*-Uleína

Tendo em vista a presença na estrutura química de bases de anéis aromáticos nitrogenados em vários fármacos antiinflamatórios utilizados na terapêutica (Fig. 8) como, por exemplo, a fenilbutazona (12), o ácido meclofenâmico (13), o diclofenaco (14), o piroxicam (15) e, particularmente a indometacina, que apresenta o núcleo indólico (16), e os alcaloides indólicos encontrados no gênero *Aspidosperma*, cria-se interesse na busca de protótipos de fármacos AINEs.

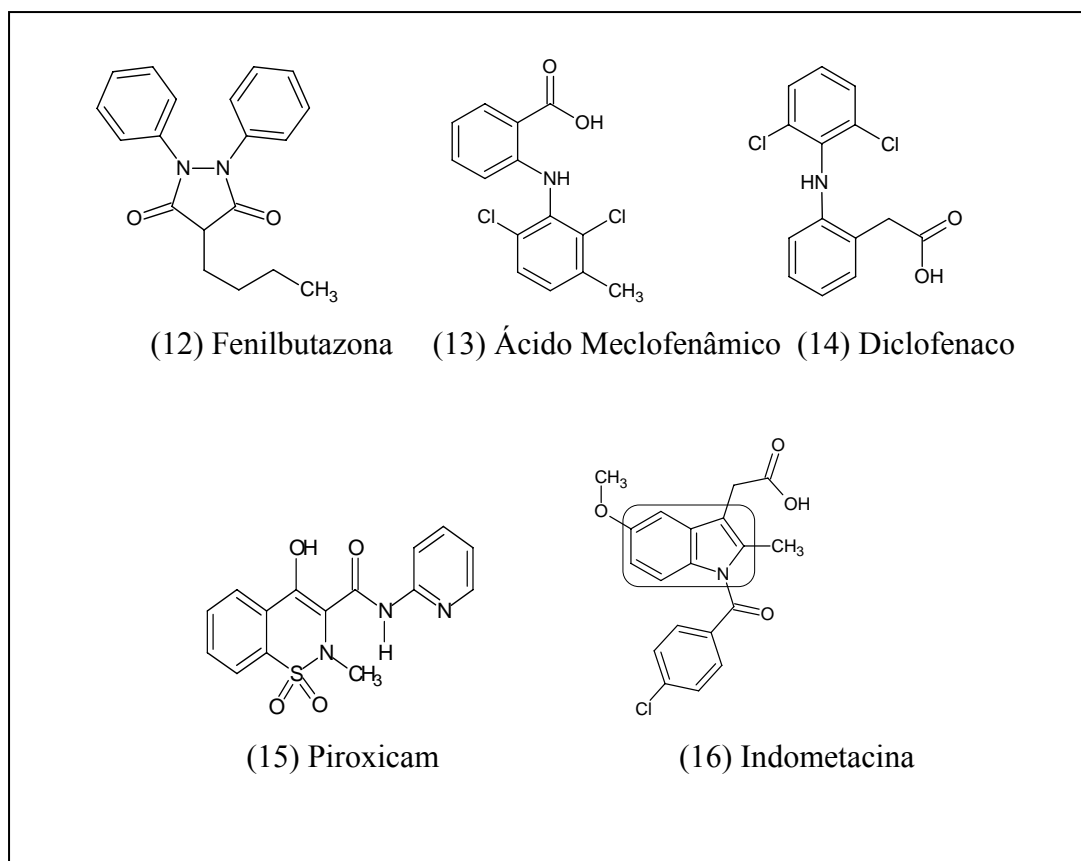


Figura 8- Estruturas de fármacos Antiinflamatórios usados na terapêutica.

Além dos alcaloides, também é relatado o isolamento de outros metabólitos secundários em espécies de *Aspidosperma*, como por exemplo, flavonoides (Fig. 9), sendo: isoramnetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo (17), isoramnetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo (18), quercetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo (19), quercetina-3-*O*-xilossilgalactosídeo (20), quercetina-3-*O*-ramnosildiglicosídeo (21), quercetina-3-*O*-xilossilgalactosilglicosídeo (22), campferol-3-*O*-ramnosilglicosídeo (23) e campferol-3-*O*-ramnosildiglicosídeo (24) isolados das folhas de *A. quebracho-blanco* (PELLOTO & DEL PERO, 1995).

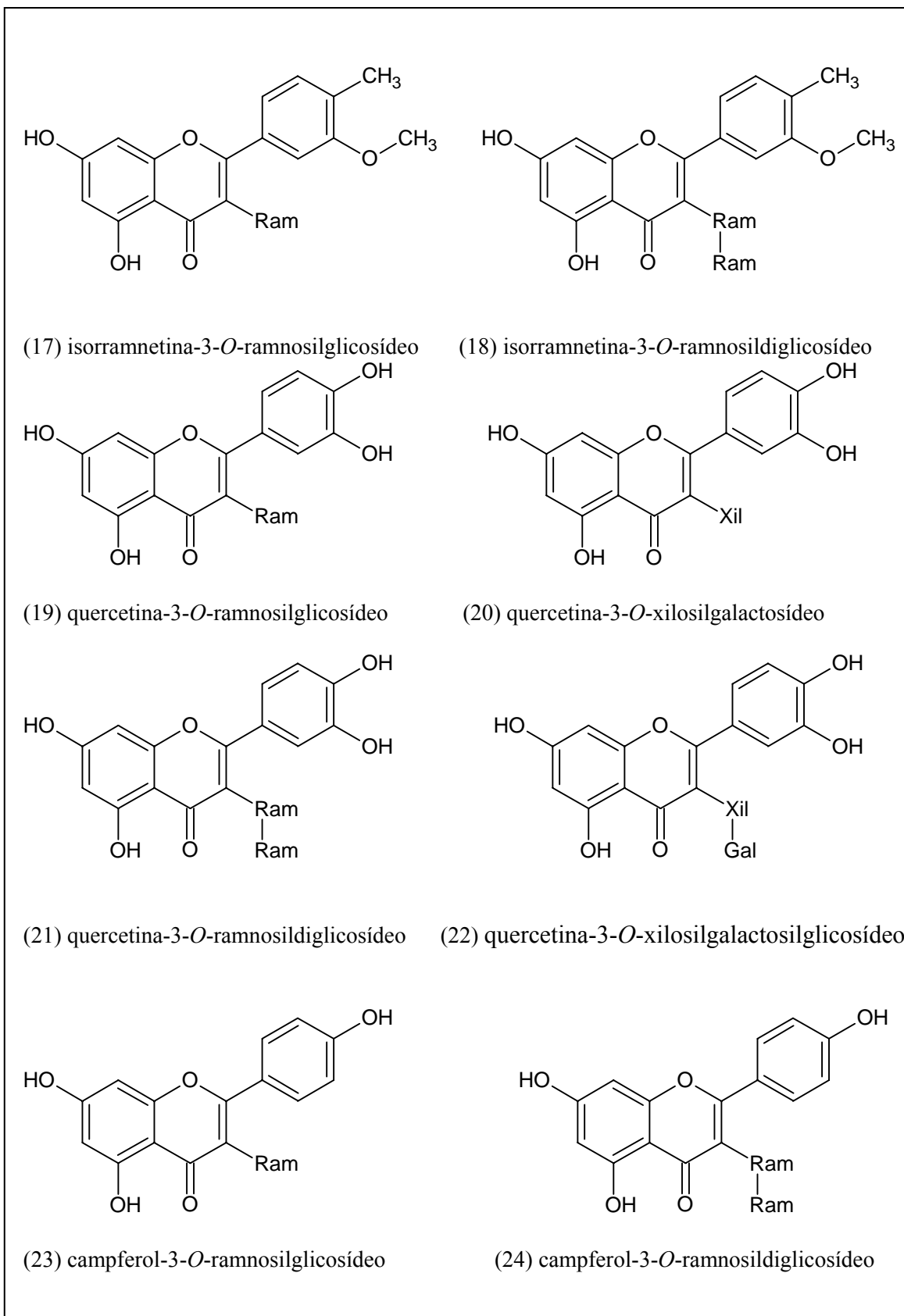


Figura 9- Flavonoides isolados das folhas da espécie *Aspidosperma quebrancho-blanco*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Coleta e identificação do material botânico:

A casca do caule da espécie *Aspidosperma tomentosum* (Mart) foi coletada em Planaltina no estado de Goiás, em maio de 2004, e identificada pelo botânico Dr. José Elias de Paula, da Universidade de Brasília, onde uma exsicata [No. JEP 3732 (UnB)] do referido material está depositada.

4.2 Obtenção do extrato:

A casca do caule da planta foi submetida à secagem em estufa a 40°C por 72 horas com posterior trituração. O material seco foi moído, fornecendo um total de 3,64 kg, posteriormente submetido à extração com 20 L de etanol 90% em percolador a temperatura ambiente por 96 h. A remoção do solvente sob pressão reduzida, em aparelho rotatório, forneceu 316,55 g (8,696%) o extrato etanólico bruto (EEB).

4.3 Filtração a vácuo do extrato etanólico bruto:

Durante o processo de concentração do extrato notou-se a formação de precipitado amarelado e, para sua retirada, uma alíquota (74,10 g) do EEB foi suspensa em metanol. A fase insolúvel foi separada do sobrenadante (água-mãe) por filtração a vácuo em funil de buchner, fornecendo 11,10 g (14,97%) do precipitado de cor amarelo clara (Fig. 10)



Figura 10- Aspecto da substância obtida após filtração a vácuo (foto: EPIFÂNIO, 2007).

4.4 Cromatografia rápida em funil de separação adaptado:

O sobrenadante (água-mãe) após a retirada do solvente foi colocado em aparelho rotatório sob pressão reduzida, fornecendo 63,00 g (85,02%). Parte, (53,00 g), foi submetida à cromatografia rápida em funil de separação adaptado para utilização de vácuo.

Este procedimento objetivou fracionar a “água mãe” pela polaridade, onde os solventes eluíram os constituintes com os quais têm afinidade, obtendo-se, assim, frações semelhantes em polaridade utilizando como suporte sílica gel desativada. A desativação foi feita utilizando 100 g de sílica para 10 mL de água destilada, por 1 hora em evaporador rotatório sem vácuo.



Figura 11- Cromatografia rápida em funil de separação adaptado (foto: EPIFÂNIO, 2007).

Pesou-se 53 g da água-mãe e incorporou-se, com auxílio de pistilo em gral de porcelana, sílica desativada até que todo o extrato tomasse forma de pó. Após secagem completa (48 h) o material foi colocado em um funil de separação adaptado forrado com algodão e uma camada de sílica (2 cm). Cobriu-se o material com mais algodão. Eluiu-se o material com os solventes segundo um gradiente crescente de polaridade iniciando-se com Hexano (Hex), Hexano-Clorofórmio (Hex-CHCl₃) 50%, Clorofórmio (CHCl₃),

Clorofórmio-Acetato de Etila (CHCl₃-AcOEt) 50%, Acetato de Etila (AcOEt), Clorofórmio-Metanol (CHCl₃-MeOH) 5%, Clorofórmio-Metanol (CHCl₃-MeOH) 10%.

4.5 Animais:

Foram utilizados grupos com 7-8 camundongos da linhagem Suíço (20-35g), machos ou fêmeas, adultos, com 6 a 8 semanas de idade. Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Alagoas para manuseio de animais em modelos de inflamação. Este trabalho teve aprovação prévia do Comitê de Ética da UFAL (nº do processo: 009468/2006-12).

Os animais foram obtidos do Biotério Central de Criação da UFAL, mantidos em gaiolas de plástico, em sala sob controle de luz (12h claro /12h escuro). Os animais foram deixados em jejum por oito horas antes do início do experimento com livre acesso à água.

4.6 Substâncias:

Foram utilizados: ácido acético (0,6%), formalina (2,5%, v/v), capsaicina (12,5 mg/ mL), indometacina (37,5 mg/kg) (Merck), Tween 80 (q.s.p.), goma arábica (q.s.p.), dipirona (40 mg/ kg), Tioglicolato 3% (Sigma Chemical), morfina (15 µmol/ kg), naloxona (2 mg/ kg) (Dimorf-Cristalia-BR) e haloperidol (1 mg/ kg) (Cristalia). O extrato, frações e isoramnetina obtidos da *A. tomentosum* foram diluídos com 20 µL de Tween 80, suspensos em goma arábica e administrados na dose de 100 mg/ kg, via oral. Dipirona e indometacina foram administradas via oral. Morfina, naloxona e haloperidol forma administrados por via intraperitoneal.

4.7 Ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COOLIER, DINNEN, SCHINEIDER, 1968):

O perfil da antinociceptivo foi avaliado em ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Este modelo nos permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal do ácido acético (0,6%), provocando fortes contorções abdominais, as quais consistem na contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de uma das patas posteriores. Após 40 minutos da administração das substâncias, foi administrado o ácido acético na cavidade peritoneal dos animais. Cinco minutos após a injeção, as contorções foram contadas durante 20 minutos. Foram feitos controles do ácido acético (controle positivo) e foi utilizado dipirona como fármaco padrão do teste. Calculou-se a porcentagem de indução da inibição mediante a redução do número de contorções totais nos grupos pré-tratados em relação ao grupo controle.

4.8 Ensaio da Placa Quente (KURAISHI *et al.*, 1983):

A atividade analgésica central foi avaliada através do teste da placa quente ($55 \pm 0,1$ °C). Os animais foram colocados sobre a placa aquecida e suas respostas ao estímulo térmico (retirada das patas traseiras ou dianteiras e saltos) foram cronometradas. Foram feitas duas medidas controle em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de “cut-off” (máximo de permanência do animal na placa de 10 segundos): a primeira medida foi realizada antes do tratamento do animal e a segunda 30 min após o tratamento. Feito isso, foi administrado o extrato, frações, isorramnetina e o fármaco padrão (morfina). As medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de

30 minutos durante 2 horas. A atividade antinociceptiva central foi avaliada pelo aumento do tempo (segundos) que o animal permaneceu sobre a placa quente.

4.9 Ensaio de nociceção induzida por formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987):

O ensaio consiste na injeção de 20 μ L de uma solução de formalina 2,5% (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira do animal, independente do peso do animal. O extrato, frações, isorramnetina e o fármaco padrão (indometacina) foram administrados 40 min antes do estímulo nociceptivo. O tempo (segundos) em que o animal permanece lambendo a pata foi registrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nociceção. Com base no padrão de respostas foi possível estabelecer dois períodos: fase neurogênica - primeiros cinco minutos e fase inflamatória - 15-30 minutos após a injeção de formalina. A atividade antinociceptiva foi avaliada pela redução do tempo (segundos) que o animal lambeu a pata.

4.10 Edema de orelha de camundongo induzido por capsaicina (SANCHEZ & MORENO, 1999):

Este ensaio consiste na administração local (orelha direita) de 20 μ L de uma solução de capsaicina diluído em acetona (12,5 mg/mL), 1 hora após a administração oral do extrato, frações, isorramnetina, fármaco padrão (indometacina) ou veículo-salina. O ensaio é caracterizado por uma resposta inflamatória aguda da orelha, com desenvolvimento de edema. Os animais foram sacrificados e suas orelhas pesadas para obtenção do índice de inflamação (II), e em seguida os pesos das orelhas inflamadas (OI) foram comparados com os pesos da orelha contra-lateral (OC) que não foi tratada com o agente flogístico. O II se dá pela subtração do peso da OI pelo peso da OC, dividido pelo peso OC, multiplicado por 100. A atividade antiinflamatória foi avaliada

pela percentagem de inibição do edema (IE): o índice de inflamação do grupo tratado (II_t) foi dividido pelo índice de inflamação do grupo controle (II_c), multiplicado por 100. Esse valor vai ser subtraído de 100 e assim obteve-se o índice de inibição do edema.

$$II = \frac{OI - OC}{OC} \times 100\% \quad IE = \frac{II_t}{II_c} \times 100\% - 100$$

4.11 Ensaio de peritonite induzida por Tioglicolato 3% (De SOUZA & RIBEIRO-DA-SILVA, 1998; SMITH, DENHARDT & TERMINELLI, 2001):

Os animais foram tratados 40 min antes da administração de 1,0 mL de tioglicolato 3%. A peritonite avalia a migração leucocitária, por meio da contagem de leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$) presentes no exsudato liberado na cavidade peritoneal. Após 4h, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e imediatamente submetidos à cirurgia para abertura do abdômen e a cavidade peritoneal foi então lavada com 3 mL de uma solução HANKS (HBSS, livre de Ca^{2+} e Mg^{2+}). Depois de massagem manual suave, o exsudato foi recuperado e o volume foi medido. O líquido foi coletado e a contagem dos leucócitos (polimorfonucleares PMNL) presentes no exsudato coletado nas cavidades abdominais foi realizada em câmara de Neubauer, diluindo as células em 1:20 em azul de tripan. Os resultados foram expressos em células $\times 10^6/\text{mL}$. A atividade antiinflamatória foi avaliada pela redução do número de células no lavado.

4.12 Ensaio de catalepsia (SANBERG *et al.*; 1988):

O animal foi colocado com as duas patas dianteiras sobre uma barra horizontal de vidro a uma altura de 5 cm do chão. O tempo que o animal ficou nessa posição foi cronometrado até 300 s em cada medição. O estado cataléptico foi considerado concluído quando o animal retirou as patas da barra ou quando ele subiu na barra. A

medição foi realizada nos tempos 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a administração do extrato, frações, isorramnetina e do fármaco padrão (haloperidol). A atividade central foi avaliada pelo aumento do tempo do animal (segundos) na posição cataléptica.

4.13 Análise Estatística:

Os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle foram feitos utilizando-se o ANOVA seguido do teste de Dunnet, no tutorial Prisma®. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

5. Resultados

Após realização da evaporação do solvente do filtrado (água-mãe/ fase solúvel), a baixa pressão em aparelho rotatório, de todas as 7 frações obteve-se as frações concentradas e homogêneas (Fig. 12). Através de análises através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, o precipitado foi identificada como 3,5,7,4'-Tetraidroxí-3'-metoxiflavona (isoramnetina) (25) (Fig. 13) (EPIFÂNIO, 2007).

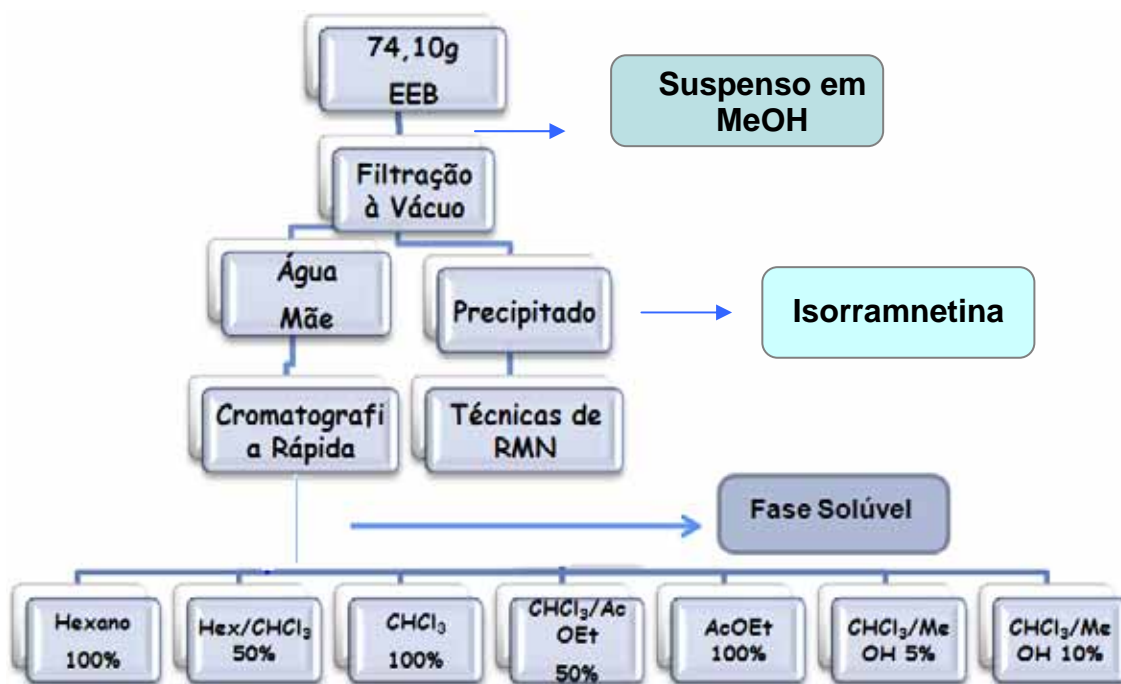


Figura 12. Organograma de obtenção das frações, fase solúvel e isoramnetina a partir do EEB da espécie *A. tomentosum*.

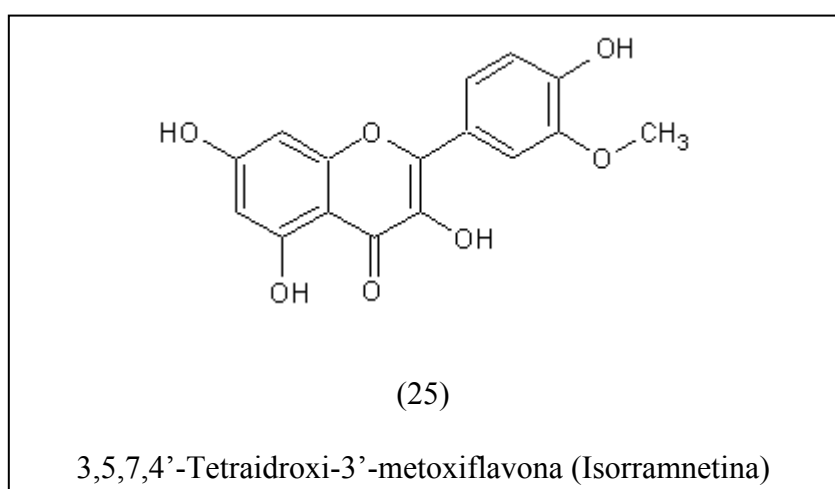


Figura 13- Flavonoide Isolado da Casca do Caule da espécie *Aspidosperma tomentosum*.

Para avaliar o perfil farmacológico do EEB, das frações e da Isorramnetina, obtidos da espécie *Aspidosperma tomentosum*, iniciou-se com o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético para detecção de atividade antinociceptiva (COOLIER, DINNEN, SCHINEIDER , 1968).

O EEB, as frações e a isorramnetina foram utilizadas na dose de 100mg/ kg, sendo a dipirona o fármaco padrão utilizado. Os resultados mostraram que algumas frações e o EEB apresentaram uma inibição da contorção abdominal quando comparados com a dipirona, um analgésico de ação periférica, que apresentou uma inibição de 64,1% (Tabela 2). O flavonoide isolado isorramnetina, apresentou uma porcentagem de inibição do número de contorções de 42,2%. Este resultado mostra uma possível ação antinociceptiva, uma vez que o EEB, algumas frações e a isorramnetina isolados da *A. tomentosum* foram capazes de diminuir o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Tabela 2 - Efeito antinociceptivo da casca do caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de contorções abdominais induzido por ácido acético.

Substância	Nº. de contorções Média ± epm	Inibição (%)
Controle	40,67 ± 1,8	---
Dipirona	14,6 ± 2,18	64,1**
EEB	19 ± 2,17	53,3**
Isorramnetina	23,5 ± 3,64	42,2**
Fase Solúvel	30,8 ± 3,02	24,8
Hexano 100%	18,6 ± 2,25	54,7**
Hex:CHCl ₃ 50%	26 ± 2,45	36,1**
CHCl ₃ 100%	39,4 ± 5,37	3,1
CHCl ₃ :AcEOt 50%	16,4 ± 2,09	59,7**
AcEOt 100%	31 ± 2,07	23,8
CHCl ₃ :MeOH 5%	20 ± 2,08	50,8**
CHCl ₃ :MeOH 10%	28,8 ± 1,83	29,2*

Resultados expressos em média ± epm; *p<0,05, **p<0,01; n =7-8; ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Para avaliação de uma possível ação central do extrato, frações e isorramnetina isolados da espécie *A. tomentosum* foi realizado o teste de placa quente. Neste ensaio, as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5%, apresentaram aumento significativo no tempo de latência do animal na placa quente (Tabela 3). Esses resultados sugerem uma possível ação analgésica central dessas frações. A morfina, um potente analgésico de ação central, foi utilizada como fármaco padrão nesse ensaio.

Tabela 3 – Efeito antinociceptivo da casca do caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de placa quente.

Substância	Leitura Pré-tratamento	Leitura Pós-tratamento			
		30min	60min	90min	120min
Controle (goma)	4,2 ± 0,7	3,7 ± 0,7	3,7 ± 0,6	3,7 ± 0,7	4,7 ± 1,2
Morfina	12,8 ± 0,4**	10,3 ± 0,8**	9,7 ± 0,7**	9,7 ± 0,95**	12,8 ± 0,4**
EEB	4,3 ± 0,5	4,8 ± 1,8	6,6 ± 1,2	5,9 ± 1,4	6,3 ± 0,9
Isorramnetina	4,1 ± 0,5	4,7 ± 0,8	4,4 ± 0,7	3,6 ± 0,8	7,2 ± 1,7
Fase Solúvel	4,6 ± 0,7	5,0 ± 0,7	4,6 ± 0,8	3,1 ± 0,4	2,9 ± 0,5
Hexano 100%	3,2 ± 0,7	2,6 ± 0,4	3,0 ± 0,4	2,8 ± 0,5	3,1 ± 0,6
Hex:CHCl ₃ 50%	4,6 ± 0,3	6,3 ± 0,9	7,4 ± 0,7*	7,0 ± 1,5	7,3 ± 1,3
CHCl ₃ 100%	3,0 ± 0,6	4,8 ± 0,6	7,8 ± 0,9*	5,3 ± 0,2	6,3 ± 1,5
CHCl ₃ :AcEOt 50%	3,9 ± 0,7	4,3 ± 0,7	3,6 ± 0,4	3,3 ± 0,8	3,9 ± 0,8
AcEOt 100%	4,3 ± 1,0	2,9 ± 0,5	4,2 ± 0,6	5,4 ± 1,4	3,7 ± 0,6
CHCl ₃ :MeOH 5%	3,2 ± 0,8	8,5 ± 1,2**	7,7 ± 1,6*	6,7 ± 1,7	7,2 ± 1,1
CHCl ₃ :MeOH 10%	4,4 ± 0,8	5,2 ± 1,2	6,7 ± 0,7	6,9 ± 1,1	6,6 ± 1,2

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média, * p < 0,05; **p < 0,01; n = 7-8; Teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet.

Com a hipótese de uma ação antinociceptiva central, foi realizado o ensaio de placa quente na presença de um antagonista de receptor opioide para investigar um possível mecanismo de ação via receptores opioides. Para isso foram utilizadas às frações que apresentaram ação antinociceptiva central no ensaio de placa quente, sendo elas: Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5%, administradas 20min após a administração de um antagonista de receptor opioide, a naloxona. Os resultados mostram que, com a presença do antagonista opioide, o efeito das frações foi abolido, sugerindo que essas frações podem estar agindo via receptores opioides (Tabela 4). Entretanto, estudos posteriores devem ser realizados para confirmar esta hipótese.

Tabela 4 - Efeito antinociceptivo da casca do caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de placa quente, na presença da naloxona.

Substância	Leitura	Leitura			
	Pré-tratamento	Pós-tratamento			
		30min	60min	90min	120min
Morfina	12,8 ± 0,4**	10,3 ± 0,8**	9,7 ± 0,7**	9,7 ± 0,9**	12,8 ± 0,4**
Morfina+ Naloxona	2,6 ± 0,5	3,3 ± 0,9	3,8 ± 0,7	2,6 ± 0,8	3,0 ± 0,4
Hex:CHCl ₃ 50%+ Naloxona	2,6 ± 0,3	3,7 ± 0,5	1,2 ± 0,2	3,6 ± 0,8	2,4 ± 0,4
CHCl ₃ 100%+ Naloxona	2,6 ± 0,4	4,2 ± 0,5	2,0 ± 0,4	3,2 ± 0,6	2,7 ± 0,3
CHCl ₃ :MeOH 5% + Naloxona	3,2 ± 0,2	3,9 ± 0,8	3,0 ± 0,7	3,3 ± 0,5	5,0 ± 1,2

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média, * p < 0,05, **p < 0,01; n = 7-8; Teste ANOVA.

Para uma melhor avaliação da resposta antinociceptiva, o EEB, as frações e a isorramnetina obtidos da *A. tomentosum*, foram submetidos ao ensaio de nocicepção induzida por formalina. Nesse ensaio o EEB suas frações e a isorramnetina apresentaram resultados significativos na primeira fase do ensaio (fase neurogênica), mostrando que a *A. tomentosum* pode modular a resposta nociceptiva. Na segunda fase (inflamatória), apenas o EEB, isorramnetina e as frações CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5% foram capazes de inibir o tempo de lambida da pata do animal (Tabela 5).

A fração CHCl₃ 100% foi a fração com melhor desempenho nas duas fases do ensaio (tempo de latência médio de 61s e 75s na primeira e segunda fase, respectivamente). O flavonoide isorramnetina apresentou um melhor desempenho na segunda fase do ensaio, apresentando um perfil antiinflamatório. O fármaco padrão utilizado neste ensaio foi a indometacina, apresentando um melhor desempenho na fase inflamatória, com 56,1% de inibição do tempo de lambida do animal.

Tabela 5 – Efeito antinociceptivo da casca do caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de formalina.

Substância	1ª fase	1ª fase	2ª fase	2ª fase
	(neurogênica)	Inibição	(inflamatória)	Inibição
	Tempo (s)	(%)	Tempo (s)	(%)
Controle	82,83 ± 5,65	---	215,7 ± 24,03	---
Indometacina	59,36 ± 8,10	23,4*	94,61 ± 24,41	56,1**
EEB	39,60 ± 2,40	55,0**	75,80 ± 29,68	64,8**
Isorramnetina	59,40 ± 6,30	35,7**	55,60 ± 32,68	74,2**
Fase Solúvel	41,80 ± 3,43	52,3**	139,60 ± 10,44	35,3
Hexano 100%	59,20 ± 4,40	31,8**	195,00 ± 28,20	9,6
Hex:CHCl ₃ 50%	62,75 ± 3,90	24,2**	204,50 ± 42,42	5,2
CHCl ₃ 100%	35,50 ± 7,04	57,1**	51,25 ± 19,35	76,2**
CHCl ₃ :AcEOt 50%	46,00 ± 5,21	49,6**	131,2 ± 18,37	39,2
AcEOt 100%	56,00 ± 2,80	32,4**	128,8 ± 9,75	40,3
CHCl ₃ :MeOH 5%	59,60 ± 3,71	31,8**	84,60 ± 27,75	60,8**
CHCl ₃ :MeOH 10%	42,20 ± 2,60	52,0**	177,80 ± 16,28	17,6

Resultados expressos em média ± epm; *p<0,05, **p<0,01. n = 7-8; ANOVA, seguido do teste de Dunnet

Para avaliar o efeito antiinflamatório, foi realizado o ensaio de edema de orelha induzida por capsaicina. Neste ensaio algumas frações apresentaram uma inibição significativa do edema induzido por capsaicina, sendo a fração em CHCl₃: AcOEt 50% a fração mais ativa, com 64,2% de inibição do edema. O fármaco padrão utilizado foi a indometacina que apresentou uma porcentagem de inibição de 79,2%, sugerindo um perfil antiinflamatório da *A. tomentosum* (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina.

Substância	% de edema	Inibição (%)
Controle	100 ± 6,65	---
Indometacina	20,84 ± 2,17	79,2*
EEB	58,17 ± 6,12	41,8*
Isorramnetina	75,09 ± 17,44	24,9
Fase Solúvel	87,01 ± 13,00	12,9
Hexano 100%	49,74 ± 13,99	50,3*
Hex:CHCl ₃ 50%	60,40 ± 10,41	39,6*
CHCl ₃ 100%	43,50 ± 8,87	56,5*
CHCl ₃ :AcEOt 50%	35,80 ± 9,72	64,2*
AcEOt 100%	39,89 ± 9,43	59,9*
CHCl ₃ :MeOH 5%	48,60 ± 7,34	51,4*
CHCl ₃ :MeOH 10%	73,69 ± 22,85	26,3

Resultados expressos em média ± epm; *p<0.05; n = 7-8; ANOVA seguido do teste de Dunnet.

Outro ensaio realizado a fim de confirmar a atividade antiinflamatória da espécie *A. tomentosum* foi o ensaio de peritonite induzida por tioglicolato a 3%. Com exceção da fração AcOEt 100%, as outras frações, o EEB e a isorramnetina reduziram significativamente o número de células no lavado peritoneal, após 4 h da administração do estímulo (Figura 14).

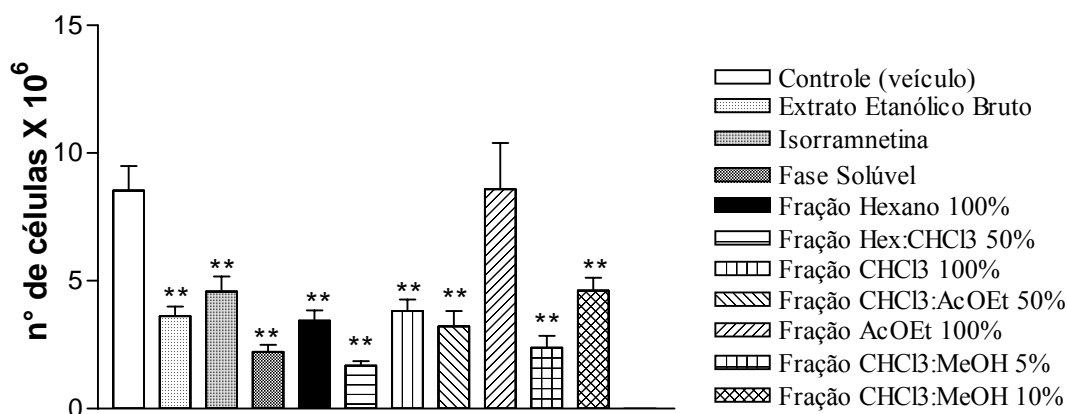


Figura 14 - Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de peritonite induzida por tioglicolato 3%, em camundongos (n = 7-8). **P < 0,01; Teste ANOVA, seguido do teste Dunnet.

As frações que apresentaram resultados significativos no teste da placa quente foram testadas no ensaio de catalepsia. Neste ensaio, o fármaco padrão utilizado foi o haloperidol, um antipsicótico que age bloqueando receptores dopaminérgicos (D2). O haloperidol induziu um forte estado cataléptico durante as quatro horas do ensaio. Os animais tratados com veículo e com as frações Hex: 50% CHCl₃, CHCl₃100% e CHCl₃:MeOH 5%, não apresentaram um estado cataléptico, permanecendo na barra até 1 min, sugerindo que essas frações isoladas da espécie *A. tomentosum* não alteram a capacidade motora do animal (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeito antinociceptivo da casca co caule da espécie *A. tomentosum* (v.o) no ensaio de catalepsia.

Substância	30min	60min	120min	180min	240min
Veículo	5,0± 0,6	3,8± 1,1	6,6± 2,6	8,7± 2,9	5,7± 0,8
Haloperidol	103,2±17,2***	174,8±37,3***	201,6±36,6***	230,5±44,0***	261,8±28,5***
Hex:CHCl ₃ 50%	10,7±2,0	22,2±9,5	20,8±7,5	19,5±6,3	11,9±2,9
CHCl ₃ 100%	6,3±1,9	4,4±0,6	10,9±2,5	13,1±4,3	5,8±0,7
CHCl ₃ :MeOH 5%	6,9±2,9	7,9±2,1	11,1±5,1	10,9±3,5	22,1±7,9

Os resultados estão expressos em média ± erro padrão da média. *** p < 0,001; n=7-8; Teste ANOVA seguido de teste Dunnet.

6. Discussão

O efeito antinociceptivo da *A. tomentosum* foi investigado com a utilização de modelos clássicos de testes nociceptivos, induzidos por estímulos químicos e térmicos. Os efeitos antiinflamatórios podem ser obtidos por uma grande variedade de agentes químicos distintos e não existe uma correlação evidente entre suas atividades farmacológicas e estruturas químicas (SERTIÉ *et al.*, 1990). Este fato, associado à complexidade do processo inflamatório, demonstra que o uso de diferentes modelos experimentais é essencial nas triagens farmacológicas de protótipos de fármacos antiinflamatórios.

O ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético trata-se de um ensaio de nocicepção periférica, onde a irritação local desencadeia a liberação de vários mediadores como a BK, substância P e PGs, bem como citocinas. Estes mediadores irão promover estimulação e sensibilização das terminações nociceptivas primárias, resultando em intensa nocicepção e hiperalgesia inflamatória sendo uma ferramenta para a avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos compostos (CUNHA *et al.*, 1991; IKEDA *et al.*, 2001; SHU, GAO & YANG, 2006).

Desta forma, o resultado obtido sugere que o efeito antinociceptivo da *A. tomentosum* possa estar relacionado à inibição da liberação de mediadores e pela inibição da migração de células que provocariam o processo doloroso.

Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférica, que consiste em estímulos de alta intensidade e a resposta nociceptiva de curta duração, este não é um modelo específico (BRAGGIO *et al.*, 2002), portanto, a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético, deve ser conduzida de forma cautelosa e levando-se em consideração os resultados de outros testes.

Uma vez que a espécie *A. tomentosum* apresentou atividade antinociceptiva no ensaio de contorção abdominal, buscou-se avaliar sua ação central em um teste específico a agentes de ação central como o ensaio de placa quente.

O calor é freqüentemente utilizado como um estímulo nociceptivo em modelo de dor aguda. O modelo da placa quente é muito conhecido por ser sensível a substâncias que atuam em nível central. O calor induz efeitos termoceptivos cutâneos e a integração do estímulo ocorre devido à estimulação de fibras C não-mielinizadas de condução lenta (HENDRY, HSIAO & BUSHNELL, 1999). O teste da placa quente caracteriza-se por apresentar uma resposta rápida ao estímulo térmico conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais (DICKENSON & BESSON, 1997).

É importante ressaltar que quando o animal é colocado sobre a placa fria (temperatura ambiente), não são observados os parâmetros comportamentais induzidos pela alta temperatura.

Neste teste, as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5%, na dose de 100 mg/kg, foram capazes de aumentar significativamente o tempo de reação ao estímulo térmico, quando comparados ao fármaco morfina, na dose de 15 µmol/ kg. O modelo de placa quente é sensível a fármacos opioides como a morfina que, a nível espinhal, inibe a transmissão dos impulsos nociceptivos através do corno dorsal (RANG *et al.*, 2007).

Com a realização do teste de placa quente foi observada uma possível ação central da espécie *A. tomentosum*, via receptores opioides. Assim, achou-se interessante repetir o ensaio de placa quente na presença do fármaco naloxona (2 mg/ kg), um antagonista de receptores opioides.

Na presença da naloxona, as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5% que tinham apresentado um efeito central, tiveram esse efeito inibido, sugerindo que a atividade antinociceptiva da *A. tomentosum* esteja relacionada aos receptores opioides centrais.

Como as Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% são frações sequenciais é provável que tenham extraídos substâncias em comum, pois a polaridade dos sistemas de solventes permite que os sistemas carreiam, em parte, as mesmas substâncias.

A extração de flavonóides utiliza solventes com polaridade crescente: a primeira extração, geralmente é feita com solvente apolar e retira óleos, gorduras, esteróis e pigmentos facilitando a extração posterior dos flavonóides. A segunda extração feita com solventes um pouco mais polares, como clorofórmio, permite recuperar as agliconas livres pouco polares tais como flavonas, flavanonas, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Aumentando a polaridade do solvente (acetona, metanol, água) se extraem as agliconas, flavonas e flavonóis mais polares (Barreto, Filho & Craveiro, 2005).

A fração CHCl₃ 100% induziu um aumento significativo do animal na placa quente porém não induziu resultado significativo no ensaio de contorção abdominal. Não foram achados na literatura dados que sustentem esse comportamento porém, por ter sua ação central revertida na presença da naloxona, existem indícios de sua possível ação via receptores opioides. O mesmo acontece com a fração Hex:CHCl₃ 50%, que não induziu efeito significativo na segunda fase do ensaio de formalina, mas induziu resultado significativo no ensaio de placa quente.

Para melhor caracterizar a atividade antinociceptiva da *A. tomentosum* foi escolhido o modelo de dor induzida por formalina em camundongos, considerado o modelo que mais se aproxima da dor clínica (TJOSEN & HOLE, 1997).

A injeção de formalina desencadeia intensa nocicepção por estimulação direta dos nociceptores, caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e sacudidas da estrutura injetada com o agente irritante. Este modelo permite avaliar a resposta de um animal à dor contínua e moderada ocasionada por injúria tecidual. Caracteriza-se por apresentar resposta ao estímulo químico na forma bifásica e distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda inflamatória em resposta a um estímulo químico (BRAGGIO *et al.*, 2002).

O EEB, as frações e a isoramnetina isolados da espécie *A. tomentosum* inibiram a primeira fase do ensaio de nocicepção induzida por formalina, sugerindo a hipótese dos efeitos antinociceptivos apresentados serem mediados pela interação com receptores associados à modulação e/ou transmissão da dor de origem neurogênica.

Neste teste, o EEB, isoramnetina e as frações CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5% foram capazes de reduzir a resposta durante as duas fases do processo algésico, sendo a inibição mais pronunciada na segunda fase, revelando uma ação desses compostos testados durante o desenvolvimento da dor inflamatória, sugerindo que a espécie *A. tomentosum* possa estar atuando sobre as terminações nervosas periféricas, através da inibição de COX (ASONGALEM *et al.*, 2004; NOGUEIRA, 2004).

Portanto, neste estudo, o resultado obtido sugere que além da atividade antinociceptiva, *A. tomentosum* apresenta também uma acentuada ação antiinflamatória.

Uma vez que a espécie *A. tomentosum* apresentou resultado satisfatório na segunda fase do ensaio de formalina, sua possível atividade antiinflamatória paralela à ação analgésica foi testada através dos modelos inflamatórios de edema de orelha induzida por capsaicina e peritonite induzida por tioglicolato 3% em camundongos.

O processo inflamatório caracteriza-se morfológicamente pela saída de fluidos e de células do sangue para o interstício, e macroscopicamente, geralmente, desenvolve-se a formação de eritema e edema (MORROW & ROBERTS II, 2007).

O modelo de edema de orelha em camundongos induzida por agentes irritantes, como a capsaicina é um modelo válido para o estudo de substâncias com potencial antialérgico e atividade antiinflamatória local. Muitas classes de fármacos, tais como: antagonistas da BK, antihistaminérgicos, antiserotoninérgicos, AINEs e antiinflamatórios esteroidais podem modular a resposta dependendo da substância edematogênica (MANTIONE & RODRIGUEZ, 1990; STERNER & SZALLASI, 1999).

A capsaicina é hábil para despolarizar neurônios sensoriais e corpos celulares, e para produzir aumento da condutância e da permeabilidade para cálcio (MARSH *et al.*, 1987). O influxo de cálcio induzido pela capsaicina também causa liberação de outros neurotransmissores e neuromoduladores das terminações periféricas das fibras sensoriais (GAMSE, 1982; HOLZER, 1988).

A formação do edema em tecidos lesionados é resultado da ação sinérgica de vários mediadores inflamatórios, que promovem, além de outros efeitos, aumento da permeabilidade vascular mediado pelo aumento do fluxo sanguíneo local e quimiotaxia. O desenvolvimento do edema é dividido em duas fases: fase precoce observada em torno de uma hora, onde ocorre a liberação de BK, H e 5-HT; e a fase tardia onde ocorre a formação de PGs, que exercem ação inflamatória direta e estimulam a liberação de outros mediadores por células presentes no sítio da inflamação (MICELI *et al.*, 2005).

O método da peritonite induzida por tioglicolato (3%) permite avaliar a migração leucocitária para a cavidade peritoneal. A migração celular é um dos passos mais importantes do processo inflamatório. Células efetoras e regulatórias chegam ao interstício através de mecanismo altamente seletivo que envolve a interação com o

endotélio vascular, diapedese através da parede do vaso e migração para a lâmina própria (WILLIAMS, 2004). Citocinas inflamatórias, tais como TNFI, IL-1 e IL-6 aumentam a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais que promoverão a adesão de neutrófilos e monócitos circulantes ao endotélio inflamado (SMYTHIES *et al.*, 2005).

A infiltração de leucócitos no local da inflamação agrava a reação inflamatória produzindo quantidades excessivas de enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, eicosanoides e citocinas, causando danos ao tecido (ROOME *et al.*, 2008).

O tioglicolato é um importante estimulador da migração leucocitária (FIEDLER *et al.*, 2006; MONTESINOS, DESAI & CRONSTEIN, 2006). A injeção local de tioglicolato provoca um suave extravasamento, porém mais duradoura acumulação de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal após 4h, mantendo os níveis basais por até 48h após sua administração. (MELNICOFF, HORAN & MORAHAN, 1989; MAUREEN, *et al.*, 1999).

A peritonite é uma condição inflamatória caracterizada por ativação nos sistemas de cascata (complemento, coagulação, cininas, fibrinólise), células (endoteliais, leucócitos, monócitos, monócitos) e liberação de mediadores (radicais livres de oxigênio, histamina, ecosanoides, fatores de coagulação e citocinas) (TEITAUM, 2006).

No modelo de peritonite induzida por tioglicolato, mastócitos e macrófagos atuam no aumento de permeabilidade vascular (KOLACZKOWSKA *et al.*, 2002). De acordo com a resposta inflamatória apresentada sugere-se que o tratamento dos animais com *A. tomentosum* esteja inibindo o mesmo perfil celular, praticamente abolindo o influxo de células polimorfonucleares para o tecido.

Considerando que o teste de contorções abdominais, assim como outros modelos de nocicepção como o teste de placa quente e de dor induzida pela formalina,

fundamenta-se na mensuração de respostas motoras dos animais, resultados falso positivos poderiam ser obtidos caso ocorresse incoordenação motora por sedação, depressão do S.N.C e/ou relaxamento muscular, foi investigado se o tratamento dos animais com *A. tomentosum* estaria causando. Assim, foi realizado o teste de catalepsia.

Vários relatos indicam que os antipsicóticos administrados aos roedores induzem comportamentos catalépticos, sendo esse efeito relacionados à diminuição da atividade de dopamina estriatal (HORNYCKIEWICZ, 1973).

Um mecanismo importante na regulação da atividade dopaminérgica é a atividade dos autoreceptores encontrados nos receptores dopaminérgicos terminais. Hoje, é amplamente aceito que autoreceptores mediem a liberação de dopamina estriatal e são controlados em parte pelo sistema muscarínico. Ono *et al.*, (1992) relataram que PGs podem participar em indução de comportamentos catalépticos, podendo alterar o limiar para a gênese de catalepsia por criar um desequilíbrio no sistema estriatal através da modulação de autoreceptores dopaminérgicos.

O tratamento com as frações Hex:CHCl₃ 50%, CHCl₃ 100% e CHCl₃:MeOH 5%, obtidos da espécie *A. tomentosum* não alterou nenhum dos parâmetros avaliados no teste catalepsia, como também não aumentou o tempo de permanência das patas dianteiras do camundongo na barra. Estes resultados excluem a hipótese de ações sedativas ou depressoras do SNC ou interferência na capacidade motora dos camundongos, dando indícios de que as frações significativamente ativas no ensaio de placa quente estejam agindo via receptores opioides.

Este estudo sugere que a espécie *A. tomentosum* apresenta efeito antinociceptivo, que pôde ser detectado em modelos de estudo baseados em estímulo nociceptivo químico, como a formalina e o ácido acético, e também em modelo com estímulo térmico (placa quente). Indicam, também, uma atividade antiinflamatória demonstrada

nos testes de edema de orelha induzida por capsaicina e peritonite induzida por tioglicolato.

Os resultados do presente trabalho indicam que os efeitos antiinflamatórios da *A. tomentosum*, possivelmente se devem a efeitos inibitórios sobre a liberação de histamina, serotonina; pela inibição da formação de PGs e/ou sobre seus receptores. Essa hipótese explicaria a capacidade do EEB e frações da *A. tomentosum* de reduzir a reatividade à dor e a formação do edema e também sua capacidade em inibir a migração leucocitária. Estes resultados também apontam para uma possível ação antinociceptiva mediada via receptores opioides.

Dentre as substâncias identificadas a partir de plantas, os flavonoides representam uma das mais importantes e interessantes classes de substâncias biologicamente ativas. Tem sido relatado que os flavonoides são bons agentes antioxidantes e antiinflamatórios (MEOTTI *et al.*, 2006; WILLAIN-FILHO *et al.*, 2008), como a quercetina e miricetrina, e que podem induzir apoptose de células cancerosas. Os flavonoides são capazes de inibir as enzimas COX e lipoxigenase (ODONTUYA, HOULT & HOUGHTON, 2005). Outra propriedade antiinflamatória de flavonoides é a sua capacidade de inibir a degranulação sugerido de neutrófilos (NIJVELDT *et al.*, 2001). Além disso, existem estudos que mostram que certos flavonoides, como daidzeína, genisteína, isorramnetina, kaempferol, quercetina, naringenina e pelargonidina, podem regular a produção de NO em resposta a estímulos inflamatórios (HÄMÄLÄINEN *et al.*, 2007).

Os resultados de uma possível ação antiinflamatória apresentada pelo flavonoide isorramnetina, demonstrada nesse trabalho, corroboram com os dados da literatura de atividade antiinflamatória dos flavonoides, inclusive a própria isorramnetina, revelada como princípio ativo antiinflamatório de espécies do gênero *Rhamnus* L., e sugere que

uma o possível mecanismo ocorra através da inibição da liberação de histamina de mastócitos peritoneal (WEI *et al.*, 2001).

Possíveis ações sugeridas nesse trabalho podem ser elucidadas com a realização de outros ensaios posteriores que permitiriam avaliar os possíveis mecanismos de ação envolvidos com sinais da inflamação e analgesia inibidos pelos tratamentos com *A. tomentosum*. Tais estudos posteriores poderão responder se esta espécie é efetivamente um agente potencial na pesquisa de novos fármacos com ação analgésica e antiinflamatória.

7. Conclusões e Perspectivas

Os dados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que o EEB, as frações e o flavonoide identificado como Isorramnetina, obtidos da espécie *Aspidosperma tomentosum* são capazes de modular a resposta antinociceptiva e antiinflamatória aguda.

As atividades antinociceptiva e antiinflamatória contribuem para o estudo etnofarmacológico da espécie *Aspidosperma tomentosum*, visando à identificação de novos protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, oriundos de plantas brasileiras.

Como perspectivas, outras partes desta planta serão estudadas química e farmacologicamente, visando à busca de frações e/ou substâncias ativas como antinociceptivas e antiinflamatórias.

Os resultados obtidos neste trabalho podem dar suporte não somente a outros trabalhos com produtos naturais e/ou plantas de uso medicinal, como também, a pesquisa por novos fármacos analgésicos e antiinflamatórios, que ainda existe um aspecto de interesse na pesquisa farmacêutica atual, principalmente no que se refere à busca por substâncias que possuam tais atividades aliadas a efeitos adversos reduzidos, possibilitando assim uso no tratamento de doenças inflamatórias crônicas, que exigem longos períodos de tratamento farmacológico.

Referências

A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA. Disponível em <http://www.s bq.org.br/PN-NET> em 31/10/2009.

AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipirone. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 42, p. 70-85, 1999.

AIMI, N.; UCHIDA, N.; OHYA, N.; HOSOKAWA, H.; TAKAYAMA, H.; SAKAI, S. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho-blanco* Schlecht. **Tetrahedron Lett**, v.37, p. 4949-52, 1991.

ALBERT, D.; ZUNDORF, I.; DINGERMANN, T.; MÜLLER, WE.; STEINHILBER, D.; WERZ, O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5- lipoxygenase. **Biochemical Pharmacology**, v.64, p. 1767–1775, 2002.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B.R. The simple β -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v.19, p.1573-82, 1980.

ARNDT, R. R.; BROWN, S. H.; LING, N. C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA-FILHO, J. M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.;DUARTE, A. P.; CARRAZZONI, E. P. Alkaloid studies - LVIII : The alkaloids of six *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v.6, p.1653-58, 1967.

ASONGALEM, E. A.; FOYET, H.S.; NGOGANG, J.; FOLEFOG, G. N.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P. Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v. 91, p. 301-308. 2004.

BALICK, M. J.; COX, P. A. Plants, People and Culture: the Science of Ethnobotany. **The Scientific American Library**, New York, 1996.

BARRETO, K.; FILHO, C.C.; CRAVEIRO, A. Método de extração direta de antocianinas para utilização como corante fotoexcitável em células solares. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**. Fortaleza, CE, 2005.

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

BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. Percepção da dor. **Princípios da neurociência**. 4ª edição. Manoele, São Paulo, 2004.

BASTOS, G.M. Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas . 2007. 107f. Dissertação de mestrado – **Faculdade de Farmácia, odontologia e Enfermagem**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BAZAN, N. G.; FLOWER, R. J. Lipid signals in pain control. **Nature**, v.420, p. 135-138, 2002.

BEAN, B. P. ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. **Journal of Neuroscience**, v.10, p. 1-10, 1990.

BIODIVERSIDADE DO MUSEU GOELDI. Disponível em [HTTP://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/not005asp](http://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/not005asp). em 31/10/2009.

BLACK, S. C. Cannabinoid receptor antagonists and obesity. **Current Opinion in Investigation Drugs**, v.5, p. 389–394, 2004.

BLYTH, F. M.; MARCH, L. M.; BRNABIC, A. J.; JORM, L. R.; WILLIAMSON, M.; COUSINS, M. J. Chronic pain in Australia: a prevalence study. **Pain**, v.89, p.127–130, 2001.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemistry System Ecology**, v.15, p. 187-200, 1987.

BONFÁ, L.; VINAGRE R. C. O.; FIGUEREIDO, N. V. Uso de Canabinóides na Dor Crônica e em Cuidados Paliativos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.58, p. 267-279, 2008.

BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. (Eds). Williams and Wilkins, Baltimore. **Medicinal Chemistry**, p.535-580, 1995.

BOUABOULA, M.; RINALDI, M.; CARAYON, P.; CARILLON, C.; DELPECH, B.; *et al.* Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. **European Journal of Biochemistry**, v.214, p. 173–180, 1993.

BOURA, A. L; SVOLMANIS, A. P. Converting enzyme inhibition in the rat by captropil is accompanied y potentiation of garrageenin-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.82, p. 3-8, 1984.

BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *sesbania virgata* (Cav.) **Pers. Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, p. 49-53, 2002.

BRASIL. **Portaria n.º 6**. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de fevereiro de 1995.

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

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

CALIGNANO, A; LA RANA, G; GUIFFRIDA, A; *et al.* Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature*. 394: 277-281,1998.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D. Floristic inventory of tropical countries: The status of plant systematics, collections, and vegetation, plus recommendations for the future. **New York Botanical Garden**, New York, 1989.

CARR, D. B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet**, v.353, p. 2051-2058, 1999.

CARVALHO, L. H.; BRANDÃO, M. G. L.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. L. C.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants in vivo in *Plasmodium berghei* infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v.24, p.1113-1123, 1991.

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

CICHEWICZ, D. L. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life Science**, v.74, p. 1317-1324, 2004.

COLLIER, H. O.; DINNEN, L. C.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology Chemistry**, v.32, p. 285-310, 1968.

CONSROE, P. Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. **Neurobiology of Disease**, v.5, p. 534-551, 1998.

CONTRAN, R. M.; KUNAR, T.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**, 6^a ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia Moderna**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 6^a ed., 2005.

CROMBIE, I. K.; CROFT, P. R.; LINTON, S. J.; LE RESCHE, L.; VON KORFF, M. editors. Epidemiology of pain. Seattle, WA: **IASP Press**, 1999.

CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, p. 765-767, 1991.

De SOUZA, I. A.; RIBEIRO-DA-SILVA, G. X. Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. **European Journal of Pharmacology**, v.363, p.189-195, 1998.

DEUTSCH, H. F.; EVANSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P. O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.12, p. 1283-1287, 1994.

- DICKENSON, A.; BESSON, J. M. The pharmacology of pain. **Berlin: Springer**, 1997.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brazilian Journal Anesthesiology**, v.75, p. 125-131, 1995.
- ENDRESS, M. E.; BRUYNS, P. V. A revised classification of the Apocynaceae. **The Botanical Review**, v. 66, p. 1-56, 2000.
- EK, M.; ENGBLOM, D.; SAHA, S.; *et al.* Inflammatory response – Pathway across the blood-brain barrier. **Nature**, v. 410, p. 430-431, 2001.
- EPIFÂNIO, W. A. N. Estudo Fitoquímico de *Aspidosperma tomentosum* na busca de agentes analgésicos e antiinflamatórios. Trabalho de dissertação: **Escola de Enfermagem e Farmácia**, Universidade Federal de Alagoas, 2007.
- FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.110, p. 127, 1993.
- FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI-FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 325, 2004.
- FIEDLER, U.; REISS, Y.; SCHARPFENECKER, M.; GRUNOW, V.; KOIDL, S.; HURSTON, G.; GALE, N. W.; WITZENRATH, M.; ROSSEAU, S.; SUTTORP, N.; SOBKE, A.; HERRMANN, M.; PREISSNER, K. T.; VAJKOCZY, P.; AUGUSTIN, H. G. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. **Nature Medicine**, v.12, p. 235-239, 2006.
- GAMSE, R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, v. 320, p. 205-216, 1982.
- GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S. Alkaloids of three *Aspidosperma* species. **Phytochemistry**, v.15, p. 1093-1095, 1976.
- GOLAN, D. E.; TASHJIAN JR., A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A.W. **Pincípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Editora: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2ª ed., 2009.
- GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K.; MESQUITA, A. A. L. Chemosystematic implications of Xanthones in Bonnetia and Archytaea. **Biochemistry System Ecology**, v.6, p. 185, 1978.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, locais e éticos. In: Simões C. A, editor. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed., Porto Alegre: UFRGS/ UFSC, p.13-28, 2003.

- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10^a ed., p.369-376, 2002.
- HAANEN, C.; VERMES, I. Apoptosis and inflammation. **Mediators of Inflammation**, v.4, p. 5-15, 1995.
- 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**, ID 45673, 2007.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. **Phytochemistry**, v.30, p.3864, 1991.
- HARSTALL, C.; OSPINA, M. How prevalent is chronic pain? **Pain: Clinical Updates**, v.11, p. 1–4, 2003.
- HENDRY, S.H.C.; HSIAO, S.S.; BUSHNELL, M.C. Somatic sensation. In: ZIGMOND, M.J.; BLOOM, F.E.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. (EDS.), **Fundamental Neuroscience**, p. 768–769, 1999.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p1027-1031, 2002.
- HOLZER, P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. **Neuroscience**, v. 24, p. 739-768, 1988.
- HORNYCKIEWICZ, O. Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). **British Medical Bulletin**, v. 29, p. 172–178, 1973.
- HOWLETT, A. C.; BARTH, F.; BONNER, T. I.; CABRAL, G.; CASELLAS, P.; *et al.* International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. **Pharmacology Review**, v. 54, p. 161–202, 2002.
- HUNSKAAR, S.; HOLE. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p. 103–114, 1987.
- IKEDA, Y., UENO, A., NARABA, H., OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v.69, p. 2911-2919, 2001.
- KOLACZKOUSKA, E.; SHAHZIDI, S.; SELJELID, R.; VAN ROOIJEN, N.; PLUTUCZ, B. Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage derived cysteinyl-leukotrienes. **Inflammation**, v.26, p. 61-71. 2002.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antinflamatórios não-esteroides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX 2): Aspectos atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.52, p. 498-512, 2002.

KURAIISHI, Y.; HARADA, Y.; ARANATI, 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. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LA CRUZ, M.G. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no Estado de Mato Grosso. **Relatório da Secretaria do Estado da Saúde**, Governo do Estado do Mato Grosso, 2005.

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

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.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G.H. Biological and phytochemical evaluation of plants XI: Isolation of aspidospermine, quebrachidine, rhazinilam, (-)-pyrifolidine, and akuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* (Apocynaceae). **Journal Pharmacology Science**, v.62, p. 218-221, 1973.

MARCHESELLI, V. L.; BAZAN, N. G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus – Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 24794-24799, 1996.

MARQUES, J. O. Dor: diagnóstico e tratamento. **Bases da Anatomia e Fisiopatologia**, Âmbito Editora, São Paulo, v.1, 2004.

MARSH, S. J.; STANSFELD, C. E.; BROWN, D. A.; DAVEY, R.; MCCARTHY, D. The mechanism of action of capsaicin on sensory C-tipe neurons and their axons in vitro. **Neuroscience**, v.23, p. 275-289, 1987.

MANTIONE, C. R.; RODRIGUEZ, R. A bradykinin (BK) 1 receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.99, p. 516-518, 1990.

MAUREEN, N. A.; ANUK, M. D.; LÁSZIO, V.; RODERICK, J. F.; CSABA, S.; MAURO, P. Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-101. **The Journal of Immunology**, v.162, p. 1685–1691, 1999.

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

- MELNICOFF, M. J.; HORAN, P. K.; MORAHAN, P. S. Kinetics of changes in peritoneal cell populations following acute inflammation. **Cell Immunology**, v.118, p.178, 1989.
- 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. **JPET**, v. 316, p. 789–796, 2006.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: **IASP, Press**, 1994.
- MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GORUGNET, R.; MICHELD, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, S. E. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p. 439–445, 2009.
- MICELI, N.; TAVIANO, M. F.; GIUFFRIDA, D.; TROVATO, A.; TZAKOU, O.; GALATI, E. M. Anti-inflammatory activity of extract and fractions from *Nepeta sibthorpii* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p.261-266. 2005.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.164, 1999.
- MITAINE, A. C.; WENIGER, B.; SAUVAIN, M.; LUCUMI, E.; ARAGO'N, R.; ZECHES-HANROT, M. Z. Indole alkaloids from the trunk bark of *Aspidosperma megalocarpon*. **Planta Médica**, v.64, p. 487, 1998.
- MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M. **Phytomedicine**, v.9, p. 142-145, 2002.
- MONTANARI & BOLZANI. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Inflamações: Conceitos Gerais e inflamação aguda. **Patologia Processos Gerais**, Atheneu, São Paulo, 2ª ed., p.109-128, 1999.
- MONTESINOS, M. C.; DESAI, A.; CRONSTEIN, B. N. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. **Arthritis Research Therapy**, v.8, p.R53, 2006.
- MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacoides e fator de ativação das plaquetas. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, cap. 26, p. 503-516. 2007.
- NAPOLITANO, N. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v.594, p. 172, 2003.

NETO, H. J. C. B. Planejamento, síntese e avaliação farmacológica de novos derivados 6-nitro-benzodioxola-N-acildrazônicos, desenhados como candidatos a protótipos de fármacos analgésicos e antiinflamatórios, sintetizados a partir do Safrol. **Trabalho de dissertação**: Faculdade de farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, A. A consensus classification for the order Gentianales with additional details on the suborder Apocyninae. **The Botanical Review**, v.60, p. 440-482, 1994.

NIJVELDT, R. J.; VAN-NOOD, E.; VAN-HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN-NORREN, K.; VAN-LEEUEWER, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p.418– 425, 2001.

NOGUEIRA, F. L. P. Estudo biotecnológico e farmacológico de *Polygala paniculata* L. **Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal**, Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 86. 2004.

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

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.

ONO, N.; ABIRU, T.; SUGIYAMA, K.; KAMIYA, H.; Influence of cyclooxygenase inhibitors on the cataleptic behaviour induced by haloperidol in mice. Prostaglandins, Leukotrienes Essent. **Fatty Acids**, v.46, p. 59– 63, 1992.

PELOTTO, J. P.; DEL PERO, M. A. Flavonoids from *Aspidosperma quebracho-blanco* leaves. **Fitoterapia**, v.66, p. 88, 1995.

PEREZ-ARBELAEZ, E. Plantas utiles de Colombia. **Editorial Victor Hugo**, Medellin, 1994.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, p. 45-61, 2002.

RAMADABRAN, K.; BANSINATHI, M. A critical analysis of the experimental evaluation of nociceptiva reactions in animals. **Pharmacology Research**, v.3, p. 263-269, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central, **INPA**: Manaus, 1999.

RICHARDSON, J. D.; AANONSEN, I.; HARGREAVES, K. M. Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v.18, p. 451-457, 1998.

ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P. *Aspidosperma* de Guyane: Alcaloides de *Aspidosperma oblongum*. **Journal of Natural Products**, v.46, p. 708, 1983.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUNAR, K. **Patologia Estrutural e Funcional**, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.

ROCHA, A. I.; REIS-LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A. A handbook of alkaloids and alkaloid – containing plants. **Acta Amazonica**, v.12, p. 381-387, 1982.

ROMING, T. L.; WEBER, N. D.; MURRAY, B. K.; NORTH, J. A.; WOOD, S. G.; HUGHES, B. G.; CATES, R. G. Antiviral activity of Panamanian plants extracts. **Phytotherapy Research**, v.6, p. 38–43, 1992.

ROOME, T.; DAR, A.; NAQVI, S.; ALI, S.; CHOUDHARY, M. I. *Aegiceras corniculatum* extract suppresses initial and late phases of inflammation in rat paw and attenuates the production of eicosanoids in rat neutrophils and human platelets. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 6-7. 2008.

RUOFF, G.; LEMA, M. Strategies in pain management: new and potential indications for COX-2 specific inhibitors. **Journal of Pain and Symptom Management**, v.25, p. S21-S30, 2003.

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

SANBERG, P. R.; BUNSEY, M. D.; GIORDANO, M.; NORMAN A. B. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioural Neuroscience**, v.102, p. 748–759, 1988.

SANCHEZ, T.; MORENO, J. J. Role of prostaglandin H synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol ester application on skin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 57, p.119-131, 1999.

SANDERS-BUSH, E.; MAYER, S. E. Agonistas e antagonistas dos receptores da 5-hidroxitriptamina (serotonina). In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, cap. 11, p. 205-219. 2007.

SCHOR, N.; BOIM, M. A.; SANTOS, O. F. P. **Medicina Celular e Molecular**: bases moleculares da biologia, da genética e da farmacologia. Editora Atheneu, São Paulo, 2003.

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

SCHULTES, R. E.; RAFFAUF, R. F. The Healing Forest: Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. **Dioscorides Press**, Portland, 1990.

SERTIÉ, J. Á.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Anti-inflammatory activity and sub acute toxicity of artemetin. **Planta Médica**, v.56, p. 36-40.1990.

SHU, X. S.; GAO, Z. H.; YANG, X. L. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p. 327-332, 2006.

SIQUEIRA-JÚNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares da inflamação. Rio de Janeiro. **Medsi**, p.238, 2000.

SMITH, S. R.; DENHARDT, G.; TERMINELLI, C. The anti-inflammatory activities of cannabinoid receptor ligands in mouse peritonitis models. **European Journal of Pharmacology**, v.432, p. 107-119, 2001.

SMYTHIES, L. E.; SELLERS, M.; CLEMENTS, R. H.; MOSTELLER-BARNUM, M.; MENG, G.; BENJAMIN, W. H.; ORENSTEIN, J. M.; SMITH, P. D. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, p. 66-75, 2005.

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

SOSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p. 211–215, 2002.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Anesthesiology**, v.76, p. 182-191, 1993.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Why is morphine not the ultimate analgesic and what can be done to improve it? **Journal of Pain**, v.1, p. 51-56, 2000.

STEELE, J.C.P.; PHELPS, R.J.; SIMMONDS, M.S.J.; WARHUST, D.C.; MEYER, D.J. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 25-31, 2002.

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

- STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. Cladistics and family-level classification of the Gentianales. **Cladistics**, v. 10, p. 175-206, 1994.
- SUYENAGA, E. S.; RECHE, E.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A.T. Antiinflammatory investigation of some species of Mikania. **Phytotherapy Research**, v.16, p. 519- 523, 2002.
- TEITEAUM, I. Cloudy peritoneal dialysate: it's not always infection. **Contrib. Nephrol.**, v.150, p. 187- 194. 2006.
- TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animals models of analgesia. In: Dickenson, A. H.; Besson, J. M. (Ed.). **The Pharmacology of Pain**, Berlin: Springer, p. 1-20, 1997.
- URBAN, L.; NAGY, J. Is there a nociceptiva carousel? **Tips**, v.18, p. 223-224, 1998.
- VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biology**, v.231, p. 232-235, 1971.
- VERHAAK, P. F.; KERSSENS, J. J.; DECKER, J.; SORBI, M. J.; BENSING, J. M. Prevalence of chronic benign pain disorder among adults: a review of the literature. **Pain**, v.77, p.231–239, 1998.
- VERPOORTE, R.; VAN BEEK, T. A.; THOMASSEN, P.; AANDEWIEL, J.; BAERHEIM-SVENDSEN, A. Screening of antimicrobial activity of some plants belonging to the Apocynaceae and Loganiaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, p. 287–302, 1983.
- VIEGAS-JUNIOR, 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**. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1000014. Advance online publication 25 April 2008.
- XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L.; *et al.* Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings National Academy Science, USA**, v.88, p. 2692-2696, 1991.
- WALKER, K.; PERKINS, M.; DRAY, A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. **Neurochemistry Internacional**, v. 26, p. 1-16, 1995.
- WALTER, L.; STELLA, N. Cannabinoids and neuroinflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, p. 775–785, 2004.
- WANG, L. X.; WANG, Z. J. Animal and cellular of chronic pain. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, p. 949-965, 2003.
- WEI, B.L.; LU, C.M.; TSAO, L.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N. In vitro antiinflammatory effects of quercetin 3-*O*-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. **Planta Medica**, v.67, p. 745–747. 2001.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v.420, p. 845-845, 2002.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, p. 193-200, 2001.

WHO. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. World Health Organization, Geneva. 2000.

WILLAIN-FILHO, A.; CECHINEL-FILHO, V.; OLINGER, L.; SOUZA, M. M. Quercetin: Further Investigation of its Antinociceptive Properties and Mechanisms of Action. **Archives Pharmacal Research**, v.31, p. 713-721, 2008.

WILLIAMS, I. R. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. **Immunology Research**, v.29, p. 283-292, 2004.

www.arboretto.blogspot.com/2008_03_01_archive.html/13/02/2010

www.mkcwb.hpg.ig.com.br/plantasmedicinais.htm/13/02/2010

www.papodehomem.com.br/we-are-all-on-drugs/15/02/2010

www.photomazza.com/?Catharanthus-roseus/13/02/2010

www.quiprona.wordpress.com/2009/11/.13/02/2010

www.scielo.br/img/revistas/abc/v85n3/26011f1.jpg/14/01/2010

www.treemail.nl/.../PlantPages/Apocynaceae.htm/13/02/2010

www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=121885/14/01/2010

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v.107, p. 13-19, 2001.