



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ALEXSANDRO MACHADO CONCEIÇÃO

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DA ENTRECASCA DA *Maytenus rigida* Mart.
(CELASTRACEAE).**

**ARACAJU – SE
2010**

ALEXSANDRO MACHADO CONCEIÇÃO

**EFEITOS ANTINOCICEPTIVO, ANTI-
INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DA
ENTRECASCA DA *Maytenus rigida* Mart.
(CELASTRACEAE).**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sara Maria Thomazzi

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Conceição, Alexsandro Machado

Efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante da entrecasca da *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) / Alexsandro Machado Conceição. – Aracaju, 2010.

67 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

Orientador (a): Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi.

1. *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) 2. Atividade antinociceptiva 3. Atividade anti-inflamatória 4. Atividade antioxidante 5. Farmacologia 6. Terapêutica medicamentosa 7. Botânica sistemática 8. Plantas medicinais I.
Título

CDU 615.276:582.766.5

*Dedico este trabalho a Tânia Machado,
minha mãe,
Augusto Conceição, meu pai, pelo apoio, carinho, e
compreensão.
Ao meu querido irmão, Wagner Augusto, por estar
sempre perto nas horas necessárias.
A minha companheira, Izadora Lisbôa, pelo
estímulo dado a minha caminhada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o guia de meus passos e ajudar a tornar real o meu anseio.

Aos meus pais Augusto Conceição e Tânia Machado pelos ensinamentos, carinho, amor, otimismo e estímulo.

A meu irmão Wagner Augusto pelo apoio prestado.

À Universidade Federal de Sergipe que por sua natureza pública e gratuita, permitiu-me realizar esse estudo, hoje expresso neste trabalho.

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sara Maria Thomazzi pela sua competência, dedicação, incentivo e paciência demonstrada durante os momentos difíceis e, principalmente, por aceitar contribuir orientando-me nesse trabalho, e pelos testes realizados em seu Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Biologia Molecular Animal.

Aos meus queridos amigos de laboratório, que me receberam tão bem, em especial a Dayseanne, Mariane e o Vítor colaboradores durante a realização dos testes farmacológicos.

Aos funcionários do Biotério da Universidade Federal de Sergipe, responsáveis pela manutenção, limpeza e atenção que tratam os animais.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Farmacologia, em especial ao Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam pela sua grande contribuição realizando em seu Laboratório de Bioquímica e Produtos Naturais os testes de atividades antioxidantes.

.

Aos animais utilizados neste trabalho, meu respeito e minha gratidão.

RESUMO

CONCEIÇÃO, ALEXSANDRO MACHADO. "Efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante da entrecasca da *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)." Sergipe: UFS, 2010. (Dissertação – Mestrado em Ciências da Saúde).

A *Maytenus rigida* Mart., conhecida popularmente como “bom-nome”, “cabelo de negro”, “casca grossa” e “pau de colher”, é uma espécie da família Celastraceae que apresenta ampla distribuição na região nordeste. Na medicina popular é indicada para o tratamento de inflamações, dores, infecções urinárias, entre outras. O presente estudo teve como objetivo contribuir para o conhecimento das ações antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante da entrecasca da *M. rigida*. Para tanto, os animais foram pré-tratados por via oral com o extrato etanólico bruto (EE) da entrecasca desta planta nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e utilizados em modelos experimentais de nocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina em camundongos), inflamação (edema de pata e peritonite induzidos por carragenina em ratos) e oxidação (método de seqüestro do radical livre DPPH). No modelo de contorções abdominais, o EE quando administrado em dose única por via oral, apresentou atividade inibitória sobre as contorções induzidas por ácido acético nas doses de 200 e 400 mg/kg ($P < 0,01$). O pré-tratamento dos animais com o EE aumentou o tempo de latência no modelo de placa quente nas doses de 200 e 400 mg/kg ($P < 0,05$), sugerindo uma ação central. No modelo de formalina, o EE apresentou atividade inibitória em ambas as fases do teste: na primeira fase nas doses de 200 e 400 mg/kg ($P < 0,01$) e na segunda fase nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg ($P < 0,05$). Utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina para avaliar uma possível atividade anti-inflamatória, observamos que a administração oral do EE aos animais não foi capaz de inibir a formação de edema na pata de ratos. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com o EE foi efetivo em reduzir a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de ratos em todas as doses utilizadas ($P < 0,01$). Nossos resultados sugerem que o EE da entrecasca da *M. rigida* apresenta atividades antinociceptiva, central e periférica, e anti-inflamatória com inibição da migração de células, devido, ao menos em parte, a sua ação antioxidante.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva; anti-inflamatória; antioxidante; *Maytenus rigida*; Celastraceae.

ABSTRACT

CONCEIÇÃO, ALEXSANDRO MACHADO.” **Antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant effects of the inner bark of *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae).**” Sergipe: UFS, 2010. (Dissertation – Master in Health Sciences).

Maytenus rigida Mart., popularly known as “bom-nome”, “cabelo de negro”, “casca grossa”, and “pau de colher” is a species of Celastraceae family that is widely distributed in the northeast. In folk medicine, it is indicated for the treatment of inflammation, pain, and infections such as in the urinary tract. This study aimed to contribute to the knowledge of the antinociceptive, anti-inflammatory, and antioxidant actions from the bark of *M. rigida*. To this end, the animals were pretreated orally with the crude ethanol extract (EE) of the inner bark of this plant at the doses of 100, 200, and 400 mg / kg and used in experimental models of nociception (writhing induced by acetic acid, hot plate and formalin in mice), inflammation (paw edema and carrageenan-induced peritonitis in rats) and oxidation (method of the scavenging of DPPH radical). In the writhing model, oral administration of the EE showed inhibitory activity on the writhing induced by acetic acid at the doses of 200 and 400 mg / kg ($P < 0.01$). Pretreatment of animals with EE increased the latency time on hot plate at the doses of 200 and 400 mg / kg ($P < 0.05$), suggesting a central action. In the formalin model, the EE had inhibitory activity in both test phases: the first phase at the doses of 200 and 400 mg / kg ($P < 0.01$) and the second phase at the doses of 100, 200, and 400 mg / kg ($P < 0.05$). Using the model of paw edema induced by carrageenan to evaluate a possible anti-inflammatory activity, we observed that oral administration of the EE was not able to inhibit the formation of edema in rats. However, pretreatment EE was effective in reducing the migration of leukocytes into the peritoneal cavity of rats at all doses used ($P < 0.01$). Our results suggest that the EE of *M. rigida* inner possesses antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities.

Key-words: Antinociceptive activity; anti-inflammatory; antioxidant; *Maytenus rigida*; Celastraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Aferências medulares dos nociceptores.....	19
Figura 2:	Local de administração da carragenina na região intraplantar de ratos.....	36
Figura 3:	Efeito do EE da entrecasca da <i>Maytenus rigida</i> no comportamento nociceptivo de camundongos avaliado no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	40
Figura 4:	Efeito do EE da entrecasca da <i>M. rigida</i> no comportamento nociceptivo de camundongos avaliado no modelo de nocicepção induzido pela formalina.....	41
Figura 5:	Efeito do EE da entrecasca da <i>M. rigida</i> no comportamento nociceptivo de camundongos no teste da placa quente.....	42
Figura 6:	Curva tempo-resposta do EE da entrecasca da <i>M. rigida</i> sobre o edema de pata em rato induzido pela carragenina.....	43
Figura 7:	Efeito do EE da entrecasca da <i>M. rigida</i> sobre o edema de pata em rato induzido pela carragenina após 4 h.....	44
Figura 8:	Efeito do EE da entrecasca da <i>M. rigida</i> na atividade anti-inflamatória em ratos avaliado no modelo de peritonite induzida por carragenina.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de fármacos isolados de espécies vegetais.....	24
Tabela 2: Detecção colorimétrica de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	29
Tabela 3: Detecção colorimétrica de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	30
Tabela 4: Prospecção fitoquímica do extrato etanólico e partições da entrecasca da <i>M. rigida</i>	38
Tabela 5: Atividade antioxidante do extrato bruto e partições da entrecasca da <i>M. rigida</i> determinado através da redução do radical livre DPPH.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ASC	Área sob a curva
BK	Bradicinina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
COX	Ciclo-oxigenase
COX-2	Ciclo-oxigenase induzível
DEXA	Dexametasona
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DPPH REM	2,2-difenil-1-picrilhidrazila remanescente
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
E.P.M.	Erro padrão da média
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50%
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP	Percentual de inibição
i.p.	Intraperitonal
MCP	Proteína quimiotática de monócito
MIP	Proteína inflamatória de macrófago
Morf	Morfina
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator ativador plaquetário
PG	Prostaglandina (s)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGI ₂	Prostaciclina
PNPIC	Programa Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
s.c.	Subcutânea
s.pl.	Subplantar
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Inflamação	16
2.2 Dor e Nocicepção	18
2.3 Radicais Livres e Substâncias Antioxidantes	20
2.4 Plantas Medicinais: Breve Histórico	22
2.4.1 Produtos oriundos de plantas	23
2.4.2 Metabólitos secundários das plantas.....	24
2.5 Breve revisão sobre o gênero <i>Maytenus</i>	25
2.5.1 <i>Maytenus rigida</i>	26
3. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E METÓDOS.....	28
4.1 Planta (coleta e identificação).....	28
4.2 Preparação do Extrato Etanólico e Partições.....	28
4.3 Prospecção Fitoquímica.....	28
4.3.1 Teste para fenóis e taninos.....	29
4.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	29
4.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.....	30
4.3.4 Teste para flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas.....	30
4.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides (Liebermann-Buchard).....	31
4.3.6 Teste para saponinas	31
4.3.7 Teste para alcalóides.....	32
4.4 Animais Experimentais.....	32
4.5 Tratamentos	33
4.6. Avaliação da Atividade Antioxidante.....	33

4.6.1 Ensaio quantitativo da atividade antioxidante pelo radical DPPH.....	33
4.7 Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	34
4.7.1 Teste das contorções abdominais.....	34
4.7.2 Teste da formalina.....	35
4.7.3 Teste de placa quente.....	35
4.8 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória.....	36
4.8.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	36
4.8.2 Peritonite em ratos.....	37
4.9 Análise Estatística.....	37
5. RESULTADOS.....	38
5.1 Prospecção Fitoquímica.....	38
5.2 Atividade Antioxidante.....	39
5.3 Atividade Antinociceptiva.....	40
5.3.1 Teste de contorções abdominais.....	40
5.3.2 Teste de formalina.....	41
5.3.3 Teste de placa quente.....	42
5.4 Atividade Anti-inflamatória.....	43
5.4.1 Edema de pata em rato.....	43
5.4.2 Peritonite induzida por carragenina em ratos.....	44
6.DISSCUSSÃO.....	46
7.CONCLUSÕES.....	50
8.REFERÊNCIAS.....	51
9.ANEXOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Esta resposta se manifesta pela presença de eritema (rubor), calor (aumento de temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e perda de função do tecido ou órgão afetado (CARVALHO, 2004).

Na tentativa de inibir o processo inflamatório, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) constituem em um grupo heterogêneo de moléculas com propriedades anti-inflamatória, analgésica e antipirética eficazes. Desafortunadamente, a frequência dos efeitos adversos descritos em seu uso continuado é alta (BJORKMAN, 1996; WALLACE, 1997).

Por outro lado, devido ao melhor conhecimento que se tem adquirido sobre a fisiopatologia do processo inflamatório, tem-se sugerido diversos níveis de atuação ou estratégia na busca de novos fármacos anti-inflamatórios, dirigidos ao controle de mecanismos específicos relevantes na resposta inflamatória.

Existem numerosos agentes, obtidos de fontes naturais, de grande diversidade química, que envolvem diferentes tipos de princípios ativos. Entre eles se encontram triterpenos, esteróides, lactonas, sesquiterpenos, flavonóides, cumarinas e alcalóides que têm demonstrado atividade anti-inflamatória em vários modelos de inflamação, atuando sobre distintos mediadores deste processo (WAGNER, 1989; LYSS et al., 1997). Isto constituiria uma fonte de novos agentes que poderiam exercer sua atividade anti-inflamatória por mecanismos distintos aos dos fármacos AINEs já existentes na terapêutica.

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Deste modo, o emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2000a).

Durante toda a evolução da humanidade, as populações vêm construindo e transformando os conhecimentos relacionados à natureza e os incorporando aos seus modos

de vida. Conhecer esses “saberes” tradicionais é necessário para conservação da biodiversidade, pois permite identificar melhor o uso das espécies nativas e as pressões a que elas estão submetidas. As plantas medicinais têm sido usadas em países em desenvolvimento como uma alternativa no tratamento de doenças. Muitos extratos e óleos essenciais isolados de plantas têm apresentado atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, o que justifica pesquisas baseadas no conhecimento da medicina popular (MARTÍNEZ et al., 1996). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente 80% da população dos países em desenvolvimento no mundo dependem da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, sendo que 85% dessas práticas envolvem plantas medicinais (BRASIL, 2006a).

Esses dados indicam o potencial de uso de plantas como fonte de novas drogas ainda inexploradas, fato este evidenciado pelo número de espécies de plantas existentes e pelo fato de apenas uma pequena porcentagem ter sido investigada através de ensaios químicos e, menor número ainda, do ponto de vista biofarmacológico.

Desta forma, com o objetivo de contribuir para um maior esclarecimento de plantas medicinais usadas pela população no combate da dor e da inflamação, e validar as atividades anti-inflamatórias e analgésicas atribuídas ao uso da *Maytenus rigida*, utilizou-se o extrato etanólico (EE) da entrecasca desta planta em modelos *in vivo* de nocicepção (contorções abdominais, placa quente e formalina) e de inflamação (edema de pata e peritonite), além de ensaio avaliação *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante (análise quantitativa de sequestro do radical DPPH).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas. Apresenta-se como uma reação complexa a vários agentes nocivos, como microrganismos e células danificadas, que consiste de respostas vasculares, migração, ativação de leucócitos e reações sistêmicas (TROWBRIDGE; EMLING, 1998), sendo considerada uma resposta fisiológica desencadeada por lesão tecidual ou estímulos antigênicos e que muitas vezes pode ser prejudicial ao organismo (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; RAO et al., 2007).

Clinicamente, a inflamação caracteriza-se por apresentar cinco sinais cardinais: eritema, edema, calor, dor e perda da função (HEIDLAND et al., 2006), provenientes da dilatação de arteríolas e aumento da permeabilidade vascular por ação de mediadores inflamatórios. Com aumento da temperatura, as reações metabólicas ocorrem com maior rapidez e liberam calor adicional. O edema surge com aumento da permeabilidade vascular (VERGNOLLE, 2008).

Esses efeitos são estabelecidos por eicosanóides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta de interesse na inflamação. Estudos recentes têm identificado novos mediadores químicos, como as citocinas (interleucina-10, fator de crescimento β) e gases (óxido nítrico) (SERHAN; CHIANG, 2004).

Os mediadores da inflamação, portanto, são substâncias formadas e liberadas, concomitante ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, fator ativador plaquetário (PAF) e etc). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos eventos característicos da reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU et al., 2007).

O processo inflamatório consiste na primeira linha de defesa a estímulos lesivos exógenos (agentes infecciosos, traumas físicos ou químicos) ou endógenos (imunológicos,

neurológicos) com finalidade de reconstruir a estrutura e a função do tecido ou órgão afetado (GARCIA-LEME et al., 1993) (Figura 1).

Independentemente da natureza do estímulo desencadeante, as células ativadas do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) iniciam a cascata de eventos, secretando, em uma etapa inicial, citocinas da família da interleucina (IL)-1 e fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas têm ação pleiotrópica, tanto local como sistemicamente. Localmente, agem sobre células da matriz ou estroma tecidual, principalmente fibroblastos e células endoteliais, causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além das próprias IL-1 e TNF, também IL-6 e IL-8, e as proteínas inflamatória de macrófago (MIP) e quimiotática de monócito (MCP) (VOLTARELLI, 1994).

Este processo pode ser dividido em três diferentes fases: inflamação aguda, inflamação crônica e resposta imune. A divisão das inflamações aguda e crônica é baseada na duração e características patológicas da reação. A inflamação aguda tem uma duração relativamente curta, de minutos, algumas horas ou alguns dias, e suas características são a exsudação de líquido e de proteínas plasmáticas (edema) e a migração de leucócitos, predominantemente de neutrófilos. A inflamação crônica, por outro lado, tem uma duração maior e associa-se, em termos histológicos, com a presença de linfócitos e de macrófagos e com proliferação de vasos sanguíneos e de tecido conjuntivo (ROBBINS et al., 1996).

A resposta imune aparece, quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta aos organismos estranhos, ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. A resposta imune pode ser dividida em respostas inata e adaptativa; o sistema imune inato é ativado imediatamente após uma infecção, desencadeando a resposta do hospedeiro ao microorganismo infectante e emitindo um sinal de ativação para a resposta imunológica adaptativa. Eventos como a vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e infiltração celular são parte da resposta imune inata, e seus componentes celulares primários são os macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e neutrófilos. Proteínas efetoras circulantes como o sistema complemento, reagentes de fase aguda e a cascata de coagulação têm importante função na imunidade inata. A resposta imunológica adaptativa ou específica só é desencadeada após o reconhecimento do patógeno pela resposta imune inata, a qual deflagra todo um conjunto de reações singularmente específicas contra o invasor e também torna as ações dos componentes da resposta inata muito mais eficazes. Os linfócitos são os principais componentes celulares da

resposta adquirida, sendo divididos em linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, isto é, produção de anticorpos; linfócitos T, que fazem a indução da resposta e são responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células; e as células NK, células linfóides ativas na resposta inata (DI VAIO; FREITAS, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

2.2 Dor e Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou descrita como tal”. Constitui um importante sistema de alarme do organismo para sinalizar a existência de ameaça à integridade tissular, sendo assim um dos sinais característicos da resposta inflamatória. Sempre que uma célula ou várias células em um tecido são lesadas, diversas substâncias são liberadas. Uma injúria periférica ou em um nervo faz com que vários mediadores inflamatórios sejam liberados, sensibilizando vários receptores da dor (nociceptores) (KATZUNG, 2000; DELEO; WINKELSTEIN, 2002).

Neste sentido, a dor parece ser influenciada por fatores tanto fisiológicos (sensoriais) quanto psicológicos, e a nocicepção refere-se apenas a parte fisiológica da dor, sem levar em consideração os aspectos psicológicos que também influenciam na percepção final da dor. De fato, o componente sensorial da dor é denominado nocicepção, ou seja, a sensação determinada pela estimulação das fibras aferentes primárias. Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo. Em animais, a dor é avaliada indiretamente através da observação comportamental evidenciada como por exemplo, o massagear ou lamber a área afetada evidenciada; desta maneira, modelos animais de dor, são de fato, modelos de nocicepção (TJOLSEN; HOLE, 1997).

A dor se inicia em terminações nervosas específicas, denominadas de nociceptores, as quais se encontram distribuídas por todo o corpo e transmitem as mensagens sob a forma de impulsos elétricos ao longo dos nervos até a medula espinhal e, em seguida, ao cérebro. Algumas vezes, o sinal desencadeia uma resposta reflexa ao chegar à medula espinhal. Quando isto ocorre, um sinal é imediatamente reenviado ao longo de nervos motores até o local original da dor, desencadeando a contração muscular. Um exemplo de resposta reflexa é a reação imediata de afastamento quando tocamos inadvertidamente alguma coisa muito

quente. Somente quando o cérebro processa o sinal e o interpreta como dor, o indivíduo passa a ter uma percepção consciente da mesma (GOODMAN; GILMAN, 1996).

As fibras nervosas que transmitem as informações sensitivas são classificadas de acordo com sua espessura. As duas fibras de menor calibre, as fibras A δ e C, são fibras nociceptivas (HOLDEN et al., 2005). As fibras A δ são mielinizadas e conduzem as sensações dolorosas bem localizadas; as fibras C são desmielinizadas, apresentam menor velocidade de condução e são responsáveis por transmitir um sinal doloroso difuso (VALE, 2000; PHILLIPS; CURRIER, 2004; DELEO, 2006) (Figura 2).

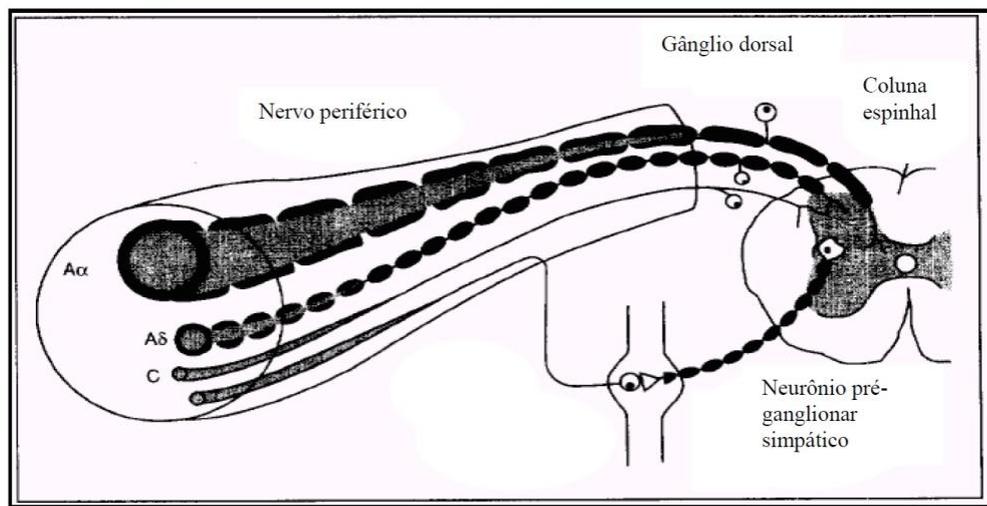


Figura 2: Aferências medulares dos nociceptores, mostrando as sinapses das fibras.

Fonte: Adaptado de Markensos (1996).

A transdução do estímulo doloroso ocorre nas terminações nervosas das fibras C não-mielinizadas e nas fibras A δ mielinizadas. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, razão pela qual são chamados de nociceptores polimodais (LEE et al., 2005).

Vários mediadores químicos conhecidos presentes no local lesado podem estimular os nociceptores e, portanto, promover a dor. Dentre os mediadores inflamatórios incluídos neste grupo estão a histamina (que também causa prurido) e a bradicinina (BK) (MAYER et al., 2007). A BK atua através de receptores ligados à proteína G, produzindo uma variedade de efeitos pró-inflamatórios que incluem vasodilatação e edema. A bradicinina também estimula atividade enzimática da fosfolipase A₂ ligada à membrana que, por sua vez, provoca a desesterificação da membrana levando à liberação do ácido araquidônico livre (ácido icosatetraenóico) e à biossíntese subsequente de prostaglandinas (por exemplo, PGE₂),

prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TX) pela ciclo-oxigenase (COX). As prostaglandinas são potentes vasodilatadoras e importantes mediadores na dor inflamatória (WIENECKE et al., 2008).

Quanto a origem da dor, caracteriza-se por apresentar quatro tipos principais de dor: a “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos; a “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central, “dor central”; a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos; e a “dor psicogênica”, que não é procedente de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

A dor pode ser subdividida em aguda e crônica. A aguda é de curta duração, geralmente persistente apenas no período de duração do dano tecidual e representa uma reação fisiológica natural do organismo. A dor crônica é evidenciada quando cessa a função dos mecanismos normais de cicatrização e em doenças como artrite reumatóide, podendo persistir por semanas, meses ou até mesmo anos (FANTONI; MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

2.3 Radicais Livres e Substâncias Antioxidantes

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (POMPELLA, 1997). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU; ANDERSON, 1997).

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas indubitavelmente, os flavonóides constituem o grupo mais representativo encontrado com elevada diversidade de formas (RICE-EVANS et al., 1995), com descrição de mais de quatro mil compostos distintos (HARBORNE, 1988). Seguindo os flavonóides, a variedade de quase mil tipos diferentes de carotenóides descritos em plantas também chama a atenção. Além destes dois grupos principais, existem outros compostos encontrados em plantas com propriedades antioxidantes já descritas na literatura, como terpenóides, cumarinas, saponinas, curcuminas, ácidos

cafeicos, ácidos hidrocínâmicos, entre outros (RICE-EVANS et al., 1995; CHEN; HO, 1997; IELPO et al., 1998; MANACH et al., 1998).

As propriedades antioxidantes dos flavonóides têm, assim, atraído a atenção para nutrição preventiva, pois eles protegem os constituintes alimentares contra o dano oxidativo, podendo também contribuir para a prevenção de importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres, entre outras. Existem vários relatos que os flavonóides exibem uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo ações antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1994) e vasodilatadora (DUARTE et al., 1993).

2.4 Plantas Medicinais: Breve Histórico

Desde épocas remotas as plantas medicinais desempenham um importante papel na humanidade. Registros da medicina demonstram que os povos egípcios, persas, hebraicos e chineses utilizavam ervas para a cura de quase todos os tipos de enfermidades, conhecendo seus benefícios e malefícios, através de relatos de determinadas plantas (VIEIRA, 2001).

Surge então a fitoterapia, que etimologicamente vem da palavra grega *Phyton* (plantas) e *Therapeia* (tratamento), ou seja, tratamento através das plantas (GUYOT, 1990; MIGUEL; MIGUEL, 1999). Para a OMS, planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos, ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos.

De acordo com a definição da Secretaria de Vigilância Sanitária, publicado pela portaria nº 5 de janeiro de 1995, fitoterápico é todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. Já o medicamento é um produto preparado seguindo procedimentos legais e que tenha sido caracterizado em termos de sua eficácia, segurança e qualidade (CALIXTO, 2000b).

A utilização das plantas medicinais é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas várias formações culturais que as usam como recurso terapêutico. Apesar do emprego empírico, as plantas medicinais continuam a ser usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (COSTA, 1994; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; SIMOES et al., 1999). Entre os fatores que motivam a sua utilização estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina

convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e à medicina institucionalizada, a consciência ecológica e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Além disso, as observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais e auxilia os pesquisadores na seleção de espécies para estudos botânicos, farmacológicos e fitoquímicos (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

Estima-se que a porcentagem da população que utiliza tratamentos não convencionais, inclusive com plantas medicinais, é de 10% na Dinamarca, 33% na Finlândia, 49% na Austrália e 48% nos Estados Unidos (NATALIA et al., 2003). Na América Latina, estes valores tendem a ser ainda mais altos, uma vez que nas regiões tropicais, existem diversas espécies de plantas medicinais de uso local, com possibilidade de geração de uma relação custo-benefício bem menor para a população, promovendo saúde a partir de plantas produzidas localmente (ARNOUS; SANTOS; BEINNER, 2005).

Atualmente, não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vêm sendo utilizado como fonte alternativa de medicamentos. Nos Estados Unidos, cerca de 25% de todos os medicamentos comercializados contêm, como princípio ativo, produtos de origem vegetal (FIEAM, 2002 apud LOURENZANI; LOURENZANI; BATALHA, 2004). Trata-se do denominado mercado mundial de medicamentos fitoterápicos que movimenta algo em torno de US\$ 22 bilhões ao ano. Com isso, este setor vem atraindo cada vez mais o interesse dos países desenvolvidos, chegando os Estados Unidos a movimentar cerca de US\$ 6,5 bilhões em 2000 e a Europa, US\$ 8,5 bilhões, sendo a Alemanha o maior mercado mundial (PINTO et al., 2002).

Diante da grande importância dos medicamentos fitoterápicos a OMS vem estimulando o uso da Medicina Tradicional/Medicina Complementar/Alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada às técnicas da medicina ocidental modernas. Com base nesse incentivo, o Ministério da Saúde aprovou, em 03 de maio de 2006, a Portaria nº 971, ou Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Essa portaria apresenta como um dos seus principais objetivos a prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde, com ênfase na atenção básica (BRASIL, 2006b).

Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”, que se constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (BRASIL, 2006c).

2.4.1 Produtos oriundos de plantas

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas.

São inúmeros os compostos extraídos de plantas empregados na preparação de agentes terapêuticos que já se encontram disponíveis no mercado farmacêutico. Muitos deles são utilizados de forma pura ou associados a outras substâncias naturais ou sintéticas. Na atualidade, aproximadamente 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e 25% são de origem vegetal, isolados ou produzidos por semissíntese (CALIXTO, 2000b).

Desta forma, alguns potentes fármacos foram descobertos, e muitos deles ainda são usados na terapêutica atual. Apenas para citar alguns exemplos, podemos mencionar a *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), vulgarmente conhecida por “papoula”, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina, isolada em 1803 por Setürner, cujo princípio ativo é empregado para combater a dor. Posteriormente, em 1932, Robiquet isolou desta mesma planta a codeína, e a papaverina foi isolada em 1948 por Merck. Outros exemplos marcantes são o da *Digitalis purpurea* L. e *Digitalis lanata* Ehr., plantas que foram a origem da descoberta de medicamentos para o coração. Delas extraem-se glicosídeos cardiotônicos chamados cardenolídeos, sendo os mais utilizados a digitoxina e a digoxina (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003; SILVA; CARVALHO, 2004).

Podemos mencionar ainda outros exemplos de fármacos provenientes de plantas medicinais como: forskolina, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (DE SOUZA, 1993), a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica (KAMCHONWONGPAISON; MESHNICK, 1996), e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se numa grande esperança para pessoas

portadoras de câncer nos ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; CORRÊA, 1995). Vários outros exemplos estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de fármacos isolados de espécies vegetais.

Fonte: Simões et al. (1999) e Yunes; Calixto (2001).

Fármaco	Classe terapêutica	Espécie vegetal
Ácido salicílico, salicina	Analgésico	<i>Salix alba</i>
Artemisinina	Antimalárico	<i>Artemisia annua</i>
Atropina	Anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i>
Capsaicina	Anestésico tópico	<i>Capsicum spp.</i>
Cocaína	Anestésico local	<i>Erythroxylum coca</i>
Colchicina	Anti-reumático	<i>Colchicum autumnale</i>
Digoxina, Digitoxina	Cardiotônicos	<i>Digitalis purpurea, D. lanata</i>
Dicumarol	Anticoagulante	<i>Melilotus officinalis</i>
Efedrina	Adrenérgico, broncodilatador	<i>Ephedra sinica</i>
Emetina	antiamebiano	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
Ergotamina	Bloquedor adrenérgico	<i>Claviceps purpurea</i>
Escopolamina	Antiparkinsoniano	<i>Datura spp.</i>
Estrofantina	Cardiotônico	<i>Strophantus spp.</i>
Fisostigmina	Antiglaucomatoso	<i>Physostigma venenosum</i>
Morfina, Codeína	Analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
Pilocarpina	Antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Quinina	Antimalárico	<i>Cinchona spp.</i>
Reserpina	Anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia spp.</i>
Riponinina	Anticoncepcional	<i>Ocotea rodiei</i>
Taxol (paclitaxel)	Anticâncer	<i>Taxus brevifolia</i>
Tubocurarina	Bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i>
Vimblastina, vincrisina	Antitumorais	<i>Catharantus roseus</i>

2.4.2 Metabólitos secundários das plantas

As plantas são ricas em substâncias que, aparentemente, não estão diretamente relacionadas com os processos metabólicos normais da fotossíntese, respiração e crescimento (EDWARDS; WRATTEN, 1981).

A maior parte das espécies de plantas superiores são capazes de biossintetizar e acumular substâncias com alguma atividade biológica em quantidades suficientes para serem extraídas de forma econômica. Tais compostos são chamados metabólitos secundários, cujos

produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da espécie no planeta (SIMÕES et al., 2008).

Esses compostos podem ser utilizados diretamente ou transformados, sendo utilizados na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e agroquímica. As funções que essas substâncias desempenham no organismo não são todas conhecidas, embora os avanços científicos na área tenham esclarecido muitas funções desses compostos (CASTRO, 2004).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas, melhor conceituados segundo Gottlieb, Kaplan e Borin (1996) como metabólitos especiais, tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças (WHEELWRIGH, 1974).

2.5 Breve revisão sobre o gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* (Celastraceae) há muito tempo já é utilizado na África do Sul como remédio anti-inflamatório e analgésico por via oral e tópica. Dentre as espécies, a *Maytenus aquifolium*, conhecida popularmente como “espinheira santa”, mostrou atividade anti-inflamatória com o extrato hidroalcoólico (KIMURA et al., 2000).

Pesquisas revelam que a casca da árvore *Maytenus senegalensis* vem sendo usada em regiões africanas, pela medicina popular, para o tratamento de reumatismo, diarreia, dispnéia e infecção de olhos (MATU; VAN STADEN, 2003). Segundo Sosa et al. (2007), o extrato da raiz da *Maytenus senegalensis* apresenta propriedades anti-inflamatórias.

Outro representante deste gênero, a *Maytenus guyanensis*, é utilizada medicinalmente como estimulante, relaxante muscular, no tratamento de reumatismo, artrites, hemorróidas e rins, além de prevenção de câncer, entre outras. Também foi demonstrado que esta espécie possui ação antioxidante (REVILLA, 2001; 2002).

Neste gênero destaca-se a espécie *Maytenus rigida*, que compreende aproximadamente 85 gêneros. Essa família é composta por aproximadamente 900 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (JOLY, 1993)

2.5.1 *Maytenus rigida*

A espécie *Maytenus rigida* Mart., conhecida popularmente como “bom homem”, “bom nome”, “cabelo de negro”, “casca grossa” e “pau de colher”, é encontrado na caatinga e cerrado, com uma maior distribuição em todo o território brasileiro, com registros para todos os estados do Nordeste e Sudeste (MARTIUS, 1840; SALES; MAYO; RODAL, 1998).

Apresenta-se como uma árvore de pequeno porte que normalmente não ultrapassa os cinco metros de altura, apresenta folhas coriáceas com bordas espinhosas, com casca lisa e fosca. A sua entrecasca apresenta aspectos terapêuticos, sendo empregado em casos de dores em geral, em especial contra afecções gástricas (hiperacidez, úlceras gástricas, duodenais e gastrite crônica), renais e uterinas, e suas folhas são utilizadas topicamente na cicatrização em problemas dermatológicos, em especial na *Tinea pedis* (“frieira”) (ANDRADE-LIMA et al., 1979; MOTA; ALBUQUERQUE, 2002; AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007; AGRA et al., 2008). Estudos recentes relatam que a casca do caule da *M. rigida* possui atividade antinociceptiva, avaliada pelo método de *tail flick* (DIAS et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante do EE da entrecasca da *M. rigida*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e partições da entrecasca da *M. rigida* em modelo *in vitro* (análise quantitativa de sequestro do radical DPPH).
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da entrecasca da *M. rigida* em modelos *in vivo* (testes de contorções abdominais, placa quente e formalina).
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da entrecasca da *M. rigida* em modelos *in vivo* (edema de pata e peritonite).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Planta (coleta e identificação)

A entrecasca da planta *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae) foi coletada no município de Jeremoabo, estado da Bahia, fazenda Barreirinhas, Reserva Arara-Azul-de-Lear (38°78'S, 10°26'O), em 21 de outubro de 2006. Um espécime foi registrado no herbário da Universidade Federal de Sergipe, com o número ASE 9613, e a identificação botânica realizada pelo professor Dr. Carlos Dias da Silva Júnior, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. As amostras foram secas em estufa (modelo MA-037) a 37°C, com renovação e circulação de ar por 48 h.

4.2 Preparação do Extrato Etanólico e Partições

A entrecasca seca da *M. rigida* foi moída e o pó resultante (4546,0 g) foi submetido à extração com etanol 90% em percolador de aço inoxidável durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo (50°C) sob pressão reduzida, obteve-se o extrato etanólico bruto da entrecasca (2461,9 g / 54,16%). O extrato etanólico da entrecasca (561,9 g) foi então ressuspenso em uma solução MeOH/H₂O (2:3) e submetido à partição líquido-líquido com C₆H₁₄ (35,1 g / 6,25%), CHCl₃ (98,4 g / 17,51%) e AcOEt (143,4 g / 25,52%). A fase resultante, hidrometanólica (171,3 g / 30,49%), também foi utilizada nos experimentos para avaliação da atividade antioxidante. O extrato etanólico e suas fases obtidas, após a partição, foram secos.

4.3 Prospecção Fitoquímica

O extrato da planta utilizada neste trabalho foi submetido à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de Matos (1997). Os métodos utilizados nesta abordagem são apenas qualitativos, e a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro. Esta

metodologia teve como objetivo detectar a ocorrência de diversos constituintes químicos presentes no EE da entrecasca da *M. rigida*, onde para os testes sete porções de 3-4 mL de cada amostra, dissolvidos em etanol, foram colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

4.3.1 Teste para fenóis e taninos

O teste se baseia na capacidade do grupo dos taninos se complexarem com íons metálicos (ferro, manganês, cobre e etc.) formando assim precipitados, e do cloreto de ferro de oxidar os fenóis. Estas reações são observadas pelo desenvolvimento de coloração verde a marrom para derivados de catecol e azulado para derivados de pirogalol.

No tubo de ensaio de número 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1 mol L^{-1} em HCl 60 mmol L^{-1} . Agitou-se bem e observou-se qualquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 .

A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro indica à presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos).

4.3.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

O teste se baseia na capacidade dos esqueletos flavônicos de mudarem de cor por ressonância eletrônica com equilíbrio ácido-base.

Na reação tomaram-se os tubos numerados de 2, 3 e 4. O tubo de número 2 foi acidificado a pH 3 com HCl 3 mol L^{-1} e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados, respectivamente, a pH 8,5 e 11 com NaOH 1 mol L^{-1} . A observação de qualquer mudança da coloração da solução foi interpretada como mostrado a seguir (Tabela 2).

Tabela 2: Detecção colorimétrica de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

Constituintes	Cor		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura

Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavononóis	-	-	Vermelho Laranja

4.3.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

O teste se baseia na possibilidade de levar a hidrólise dos o-heterosídeos flavônicos por temperatura. As hidrólises alcalinas e ácidas facilitam a identificação dos núcleos flavônicos.

Para a reação, acidificou-se o conteúdo do tubo 5 com HCl 3 mol L⁻¹ até pH 1-3 e alcalinizou-se o conteúdo do tubo 6 com NaOH 1 mol L⁻¹ até pH 11. Os tubos foram aquecidos cuidadosamente. Modificações na coloração foram observadas, por comparação com os tubos correspondentes usados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi feita como mostrado a seguir (Tabela 3).

Tabela 3: Detecção colorimétrica de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas.

Constituintes	Cor	
	Meio Ácido	Meio Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	-
Flavononas	-	Vermelho Laranja

4.3.4 Teste para flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas

Essa reação baseia-se no fato de os derivados flavônicos de cor amarela reduzirem-se adquirindo coloração avermelhada ou, no caso dos antocianínicos, azulada, quando em solução alcoólica ácida e em presença de magnésio.

No tubo de número 7, foram adicionados 10 mg de Mg granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência. A mudança na cor da mistura da reação nos tubos 5 e 7 foi observado por comparação. O aparecimento ou intensificação da cor vermelha foi indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

4.3.5 Teste para esteróides e triterpenóides (Liebermann-Buchard)

Essa reação é usada para verificar a presença de núcleo esteroidal ou triterpenoidal. Para o teste adicionaram-se 10 mL de uma solução etanólica de cada amostra em beakers e deixou-se secar em banho-maria. O resíduo seco de cada becker foi extraído três vezes com porções de 1-2 mL de CHCl_3 . Os extratos foram separados em tubos diferentes e, em seguida adicionaram-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrada a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio bem seco. Adicionou-se 1 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente. Adicionaram-se cuidadosamente três gotas de H_2SO_4 concentrado. Agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida da verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.3.6 Teste para saponinas

Essa reação baseia-se no fato que os heterosídeos saponosídeos têm propriedades detergentes e surfactantes, e quando tratados com HCl e aumento de temperatura ocorre hidrólise das saponinas, precipitando as agliconas, e perdendo as propriedades detergentes.

Para o teste tomaram-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três min e observou-se a formação da espuma.

O aparecimento de espuma persistente e abundante (colarinho) indica a presença de saponinas.

Para confirmar a presença de saponinas, adicionaram-se 2 mL de HCl concentrado ao conteúdo do tubo de ensaio, o qual foi imerso por uma hora em banho-maria. Posteriormente, neutralizando, resfriando-o e agitando-o novamente.

A presença de precipitado e a não formação de espuma foram utilizadas para confirmar a presença de saponina.

4.3.7 Teste para alcalóides

Para o teste, as amostras foram dissolvidas em etanol e filtradas. Ao filtrado foi adicionada uma solução de NH_4OH 6 N até atingir pH 11 e foram extraídas as bases orgânicas com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de clorofórmio, em um funil de separação (reservou-se a fase aquosa para o teste para bases quaternárias). Retirou-se a solução clorofórmica e filtrou-a com Na_2SO_4 anidro para eliminar o excesso de água. Separou-se o filtrado em duas porções. Uma das porções foi deixada secar para teste em cromatoplaça e da outra porção foram re-extraídas as bases orgânicas com três pequenas porções sucessivas de HCl diluído a 0,1 N. Dessa mistura foi descartada a solução clorofórmica e dividida a solução aquosa ácida em três tubos de ensaio (evitando a presença de solvente orgânico). Adicionaram-se a cada tubo três gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides, “Hager” (solução saturada de ácido perico), ”Mayer” (solução de iodeto de potássio e cloreto de mercúrio) e “Dragendorff” (solução de iodeto de potássio e subnitrito de bismuto).

A presença de precipitado floculoso, pesado em pelo menos dois tubos, sugere a presença de alcalóides.

4.4 Animais Experimentais

Os animais adultos jovens, camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* (20-30 g) e ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* (120-180 g) de ambos os sexos, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil) e trazidos para o biotério local do Departamento de Fisiologia, onde permaneceram por pelo menos dois dias até o manuseio. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos e mantidos em caixas plásticas (5 ratos ou 10 camundongos por caixa) em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12:12 h, e troca diária da serragem.

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos durante o período das 8 às 17 h, e de acordo com as normas de procedimentos sobre cuidados com os animais do Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe, para uso de animal em pesquisa, o qual segue os princípios de cuidados com animais de laboratório (CEPA, protocolo 15/08, aprovado em 10/06/2008, Anexo 1). Os animais submetidos à administração oral do extrato foram colocados em jejum por 12 h e aclimatizados no laboratório por pelo menos 2 h antes do

experimento. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o sofrimento, sendo administrado anestésico quando necessário.

Posteriormente, após o manuseio dos animais nos procedimentos *in vivo*, estes foram eutanasiados com uma dose excessiva de anestésico e deslocamento cervical, acondicionados em sacos plásticos brancos e guardados em freezer reservado para esta finalidade, até que fossem descartados definitivamente conforme a rotina do Departamento de Fisiologia, pelo serviço de coleta seletiva de lixo biológico da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

4.5 Tratamentos

Os animais foram pré-tratados com o EE bruto da entrecasca da *M. rigida* em diferentes doses (100, 200 e 400 mg/kg) ou com o veículo (Tween 80 a 0,2% em salina, 10 mL/kg, controle) por via oral (v.o.) 1 h antes dos compostos. Grupos separados de animais foram tratados com ácido acetilsalicílico (AAS, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, 300 mg/kg, v.o., 60 min antes), dexametasona (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, 2 mg/kg, s.c., 60 min antes) ou morfina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA, 10mg/kg, i.p., 30 min antes), os quais foram utilizados como controles, dependendo do teste.

4.6 Avaliação da Atividade Antioxidante

4.6.1 Ensaio quantitativo da atividade antioxidante pelo radical DPPH

A análise da atividade antioxidante foi realizada de acordo com o método descrito anteriormente por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Sánchez-Moreno, Larrauri e Saura-Calixto (1998), com pequenas modificações. O sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) foi acompanhado pelo monitoramento da diminuição na absorbância a 515 nm, a qual ocorre devido à redução pelo antioxidante.

A curva de calibração foi determinada por diluições da solução estoque do radical DPPH (40 µg/mL) para concentrações finais de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL. A absorbância de cada concentração padrão foi monitorada por um espectrofotômetro (UV BEL photonics 1105) a 515 nm. As medidas foram realizadas em triplicata com intervalos de 1 min. A

equação da concentração x absorvância da curva de calibração para o radical DPPH foi $C=110,547-0,02804A$, onde C é a concentração do radical DPPH no meio, e A é a absorvância a 515 nm. O coeficiente de correlação foi $R=0,9983$.

Soluções contendo 500 $\mu\text{g/mL}$ do EE da entrecasca da *M. rigida* e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica foram preparadas em metanol e diluídas nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g/mL}$.

O desaparecimento do radical DPPH foi monitorado pela diminuição na absorvância a 515 nm, a qual foi registrada após 0, 1, 5 e 10 min, e subsequentemente a cada 10 min, até completar 60 min (SOUSA et al., 2007). O controle negativo foi o metanol puro usado para dissolver as amostras, enquanto o controle positivo foi o ácido gálico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) dissolvido em metanol nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g/mL}$. A mistura metanol e amostra foi utilizada como branco.

A concentração do radical DPPH na mistura de reação foi calculada da curva de calibração, onde a [DPPH] é expressa em $\mu\text{g/mL}$. A porcentagem de DPPH remanescente (%DPPH_{REM}) foi calculada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), como demonstrada a seguir: $\%DPPH_{REM} = [DPPH]_T / [DPPH]_{T_0} \times 100$, onde T é o tempo no qual a absorvância foi determinada (1-60 min) e T_0 é o tempo zero. A quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical DPPH em 50% (IC₅₀) foi calculada pela realização gráfica da %DPPH_{REM} no tempo de 60 min *versus* várias concentrações de cada amostra. Os resultados estão expressos como μg de antioxidante / mL de DPPH \pm desvio padrão. Os valores de absorvância observados em todas as amostras (30 $\mu\text{g/mL}$) no tempo de 60 min foram transformados em porcentagem de inibição (IP).

4.7 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

4.7.1 Teste das contorções abdominais

As contorções abdominais foram induzidas pela administração intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético a 0,6% (Merck, Damstadt, Alemanha, 0,1 mL/10 g) em camundongos, 60 min após a administração por v.o. do EE da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, $n = 6$), AAS (300 mg/kg, $n = 6$) ou veículo em solução de salina a 0,9% (tween 80 a 0,2%, 0,1 mL /10 g, grupo controle negativo, $n = 6$).

Em seguida o número das contorções abdominais foi observado, em câmaras individuais, por um período de 20 min, iniciando logo após a administração do ácido acético (KOSTER; ANDERSON; BEER, 1959). As contorções abdominais consistem de uma contração da musculatura abdominal junto com um estiramento de membros posteriores.

4.7.2 Teste da formalina

Este teste de nocicepção foi induzido pela administração de formalina a 1% (Baker, Santo Amaro, Brasil, 20 µL), injetada por via subplantar (s.pl.) em uma das patas posteriores dos camundongos, após a administração do EE bruto da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o., 60 min antes, $n = 6$), veículo (tween a 0,2% em salina, 0,1 mL/10 g, v.o., 60 min antes, $n = 6$), AAS (300 mg/kg, v.o., 60 min antes, $n = 6$) ou morfina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes, $n = 6$).

O tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo sua pata foi cronômetrado em dois períodos: durante a primeira fase (0-5 min após a injeção de formalina), e durante a segunda fase (20-25 min após a injeção de formalina) (DUBUISSON; DENNIS, 1977).

4.7.3 Teste de placa quente

No modelo da placa quente a nocicepção foi induzida por um estímulo térmico em placa quente de alumínio, aquecida a $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$, em camundongos, após a administração do EE bruto da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o., 60 min antes, $n = 6$), tween 0,2% em salina 0,9% (v.o., 60 min antes do primeiro estímulo térmico, $n = 6$) ou morfina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes do primeiro estímulo térmico, $n = 6$).

Foi observado, por um tempo máximo de 30 s, o tempo do aparecimento de reações (latência, em *s*) ao estímulo térmico da placa quente, como sapatear ou lamber as patas. Esta reação foi tomada como índice de nocicepção (EDDY; LEIMBACH, 1953). As medidas foram realizadas individualmente nos tempos de 0, 30, 60 e 120 min após o primeiro estímulo térmico.

4.8 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.8.1 Edema de pata induzido por carragenina

No modelo de edema de pata foi utilizado a carragenina na concentração de 1% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), administrada no volume de 0,1 mL/animal na região subplantar da pata traseira direita do rato, segundo o método descrito anteriormente por Winter et al. (1962), com pequenas modificações (Figura 3).

Os ratos foram pré-tratados por v.o. 1 h antes com o EE bruto da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, $n = 6$), AAS (300 mg/kg, grupo padrão, $n = 6$) ou tween 0,2% em salina a 0,9% por v.o. 60 min antes do agente edematogênico (grupo controle negativo, $n = 6$).

O edema da pata foi medido através de um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), observando-se o deslocamento da coluna de líquido, imediatamente antes da injeção subcutânea do agente edematogênico carragenina (HARRIS; SPENCER, 1962). Medidas do volume da pata foram novamente realizadas em intervalos regulares de 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da carragenina.

Também foram calculados os valores de área sob a curva (ASC) no intervalo de 0 a 4 h, utilizando a regra trapezoidal, para cada grupo.



Figura 3: Local de administração da carragenina na região subplantar de ratos. Fonte: Adaptado de Buritova et al. (1996).

4.8.2 Peritonite em ratos

A migração de leucócitos foi induzida pela injeção de carragenina (500 µg/cavidade, i.p., 500 µL) na cavidade peritoneal de ratos 1 h após a administração do EE bruto da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o., $n = 6$), dexametasona (2 mg/kg, s.c., $n = 6$, controle positivo) ou tween 0,2% em solução salina 0,9% (veículo, v.o., $n = 6$), de acordo com a técnica descrita anteriormente por Bastos et al. (2007).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical 4 h após a injeção de carragenina. Posteriormente, solução salina contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 1 mM, i.p., 10 mL) foi injetada e massagem suave foi realizada para uma subsequente coleta do fluido peritoneal, o qual foi centrifugado (1.000 rpm, 5 min) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de salina. Uma alíquota de 10 µL da suspensão foi diluída em 190 µL de solução de Turk e as células totais foram contadas em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico.

Os resultados estão expressos como número de leucócitos/mL. A porcentagem de inibição de leucócitos = $(1 - T/C) \times 100$, onde T representa a contagem de leucócitos dos grupos tratados e C representam a contagem de leucócitos do grupo controle.

4.9 Análise Estatística

Os resultados das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória estão expressos como média \pm erro padrão das médias (E.P.M.). A atividade antioxidante foi avaliada usando o programa Origin 7.5 (Microcal, Northampton, MA, USA) e os valores estão apresentados como média \pm desvio padrão (triplicata). A avaliação estatística dos dados foi realizada usando a análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do teste de Tukey. Valores de P menores que 0,05 serão considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Prospecção Fitoquímica

A análise fitoquímica do EE da entrecasca da *M. rigida* mostrou a presença de fenóis totais, taninos, flavonas, flavanonóis, xantonas, heterosídeos flavonóides, esteróides, triterpenóides e heterosídeos saponínicos. Na partição hexânica encontram-se apenas esteróides e triterpenóides. Fenóis totais, flavonas, flavanonóis e xantonas são encontrados na partição clorofórmica. Já na partição acetato de etila foram encontradas quantidades de fenóis totais, taninos, flavonas, flavanonóis, xantonas e heterosídeos flavonóides. Em adição, a partição hidrometanólica mostrou quantidades de fenóis totais, taninos, flavonas, flavanonóis, xantonas, heterosídeos flavonóides e heterosídeos saponínicos.

Os resultados das análises dos constituintes químicos do EE e partições da entrecasca da *M. rigida* encontram-se dispostos na Tabela 4.

Tabela 4: Prospecção fitoquímica do EE e partições da entrecasca de *M. rigida*.

Entrecasca da <i>M. rigida</i>					
Classe de substância	EE	Partição Hexânica	Partição Clorofórmica	Partição Acetato de Etila	Partição Hidrometanólica
Fenóis totais	+	-	+	+	+
Taninos	+	-	-	+	+
Flavonas, Flavanonóis e Xantonas	+	-	+	+	+
Heterosídeos Flavonóides	+	-	-	+	+
Esteróides e Triterpenóides	+	+	-	-	-
Heterosídeos Saponínicos	+	-	-	-	+

- Negativo, + positivo.

5.2 Atividade Antioxidante

A quantidade de radical DPPH que reagiu com a partição hexânica (30 µg/mL, 60 min) foi baixa (37,30%), enquanto que para as partições clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica foram consumidas 79,52%, 64,42% e 94,43% do radical DPPH, respectivamente (Tabela 5). O EE bruto da entrecasca da *M. rigida* consumiu 93,80% do radical DPPH, apresentando uma resposta similar ao controle positivo ácido gálico (96,24%, 30 µg/mL, 60 min, Tabela 5).

De acordo com os valores de IC₅₀, a concentração de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial do radical DPPH é superior para a partição hexânica (P < 0,05). As IC₅₀ para o EE bruto e partições clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica foram estatisticamente similares ao apresentado pelo ácido gálico (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade antioxidante do EE e partições da entrecasca da *M. rigida* determinado através da redução do radical livre DPPH.

Amostras	IP (%)	IC ₅₀ (µg/mL DPPH)
Extrato Etanólico bruto	93,80	8,89 ± 1,87 ^a
Partição Hexânica	37,30	229,38 ± 8,42 ^b
Partição Clorofórmica	79,52	15,66 ± 1,54 ^a
Partição Acetato de Etila	64,42	15,24 ± 1,87 ^a
Partição Hidrometanólica	94,43	12,09 ± 1,93 ^a
Ácido Gálico	96,24	9,33 ± 0,22 ^a

Valores com letras diferentes são diferentes estatisticamente; P < 0,05 em relação ao controle ácido gálico. IP das amostras (30 µg/mL) foram calculados no tempo de 60 minutos. IC₅₀ das amostras foram calculadas no tempo de 60 min utilizando DPPH na concentração de 40 µg/mL.

5.3 Atividade Antinociceptiva

5.3.1 Teste de contorções abdominais

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram o efeito do EE da entrecasca da *M. rigida* sobre o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As doses de 200 e 400 mg/kg reduziram ($P < 0,01$) o número de contorções abdominais em 34,1 e 40,0%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. O AAS (300 mg/kg) exibiu significativa inibição de 75,9% ($P < 0,001$) sobre as contorções abdominais, quando comparada ao grupo controle (Figura 4).

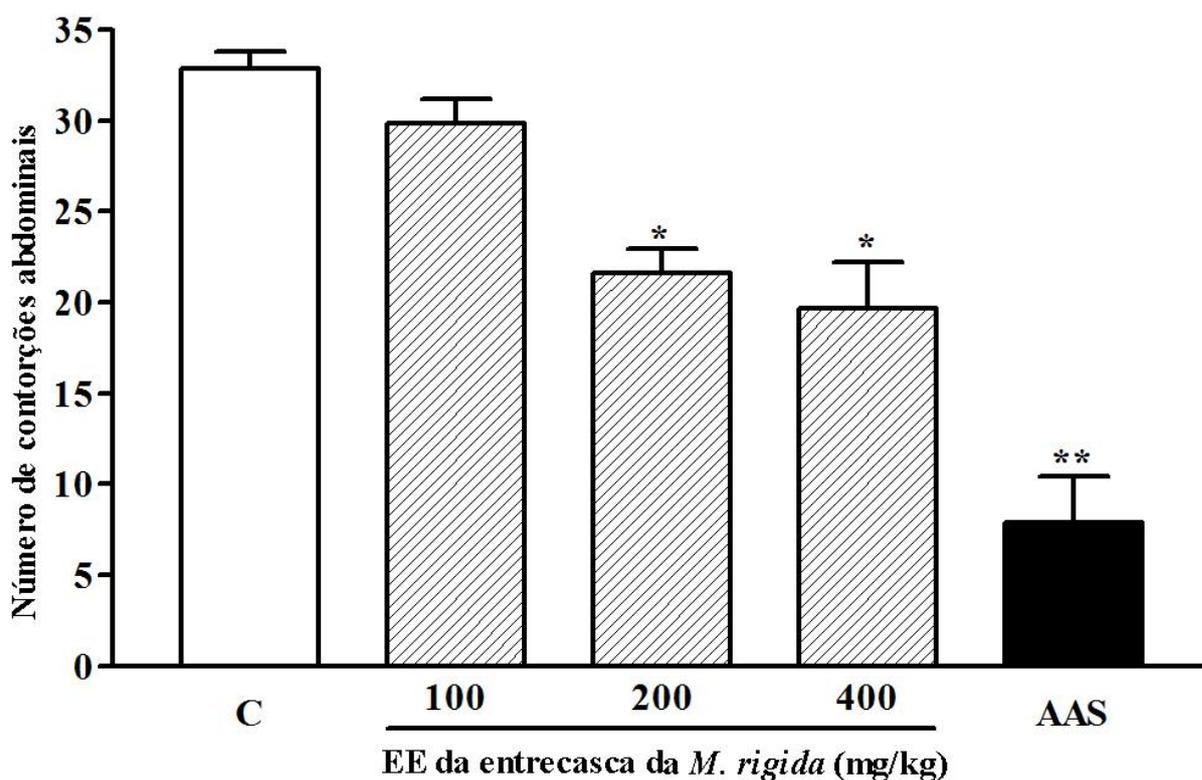


Figura 4: Efeito do EE da entrecasca da *M. rigida* no comportamento nociceptivo de camundongos avaliado no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. A nocicepção foi registrada pelo número de contorções observadas durante 20 min após a injeção i.p. do ácido acético. Os grupos de animais foram pré-tratados com veículo (C, grupo controle), ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg) ou EE (100–400 mg/kg), por v.o., 60 min antes do agente irritante. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.3.2 Teste da formalina

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram que no teste da formalina o EE da entrecasca da *M. rigida* administrado aos animais produziu uma inibição na primeira fase (fase neurogênica) nas doses de 200 e 400 mg/kg ($P < 0,01$, $n = 6$), e na segunda fase (inflamatória) em todas as doses administradas (100, 200 e 400 mg/kg, $P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. O AAS (300 mg/kg, v.o., 60 min antes) causou inibição apenas na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina ($P < 0,001$, $n = 6$) e a morfina (10 mg/kg, i.p., 30 min antes) causou inibição significativa em ambas as fases ($P < 0,001$, $n = 6$, Figura 5).

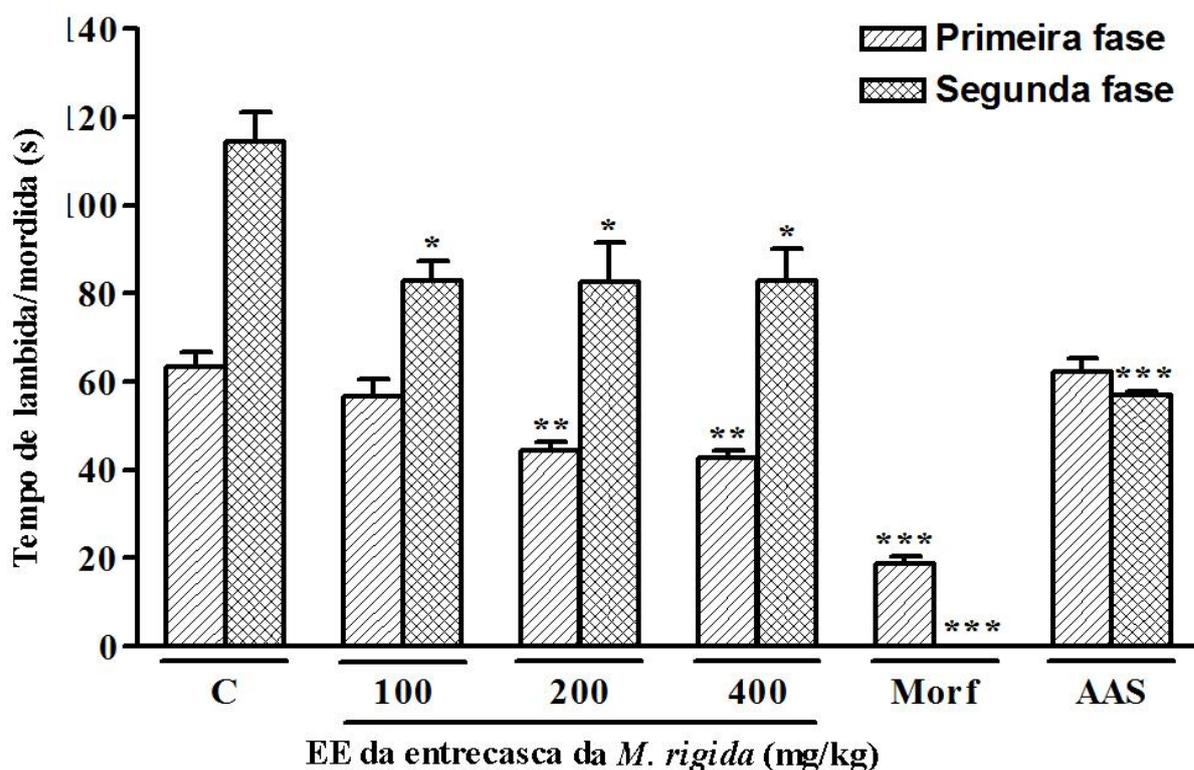


Figura 5: Efeito do EE da entrecasca da *M. rigida* no comportamento nociceptivo de camundongos avaliado no modelo de nocicepção induzido pela formalina. Os grupos de animais foram pré-tratados com veículo (C, grupo controle, 10 mL/kg, v.o., 60 min antes), ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg, v.o., 60 min antes), morfina (Morf, 10 mg/kg, i.p., 30 min antes) ou EE da entrecasca da *M. rigida* (100–400 mg/kg, v.o., 60 min antes), contra a primeira fase (0-5 min) ou fase tardia (20-25 min) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao respectivo grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.3.3 Teste de placa quente

Os resultados sumarizados na Figura 6 mostram que no teste de placa quente o pré-tratamento dos animais com o EE da entrecasca da *M. rigida* na dose de 200 mg/kg prolongou de maneira significativa o tempo de latência (tempo que os animais necessitam para manifestar uma reação estereotipada ao estímulo térmico) em 120 min ($P < 0,01$), já na dose de 400 mg/kg prolongou de maneira significativa nos tempos de 30, 60 e 120 min ($P < 0,05$), após o primeiro estímulo térmico. A morfina mostrou-se eficaz em todos os tempos observados ($P < 0,001$).

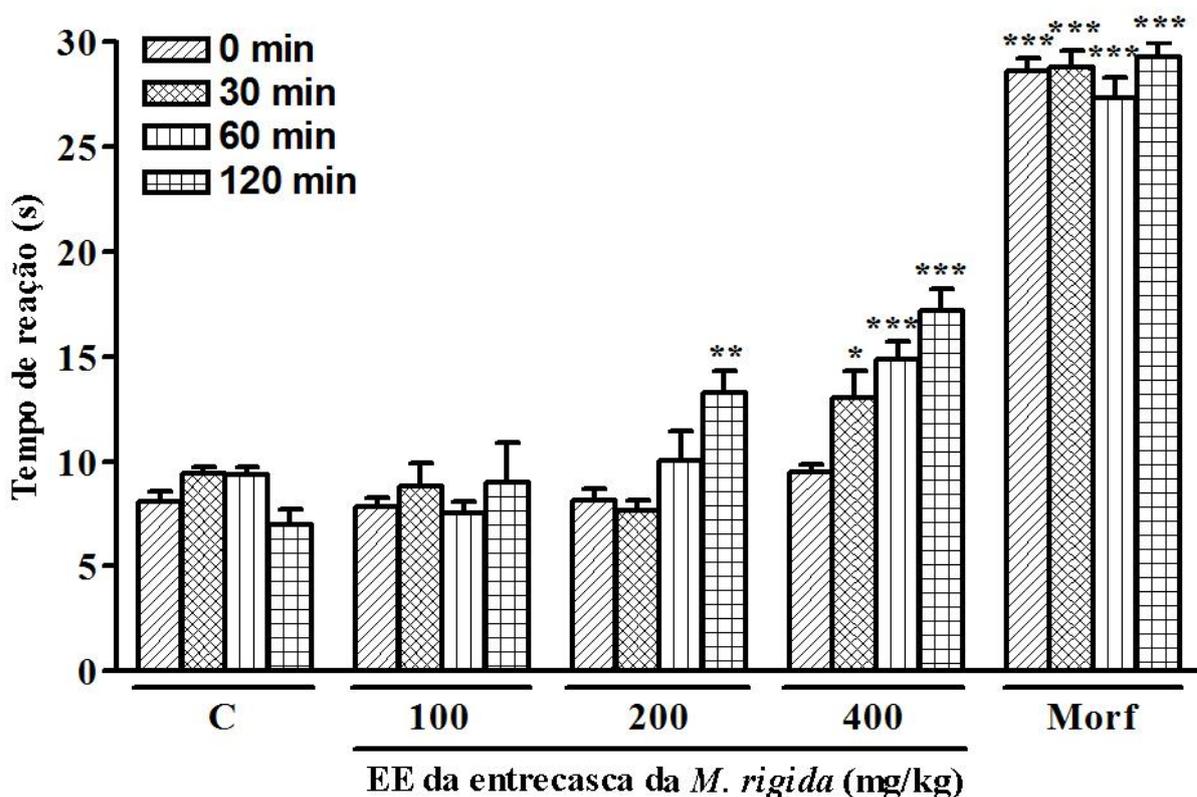


Figura 6: Efeito do EE da entrecasca das *M. rigida* no comportamento nociceptivo de camundongos no teste da placa quente. A nocicepção foi avaliada como a latência (tempo de reação, s) dos animais elevarem as patas da placa aquecida a $55 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Os grupos de animais foram pré-tratados com veículo (C, grupo controle, v.o., 60 min antes), morfina (Morf, 10 mg/kg, i.p., 30 min antes) ou EE da entrecasca da *M. rigida* (100–400 mg/kg, v.o., 60 min antes), e medidas foram realizadas nos tempos de 0, 30, 60 e 120 min após o primeiro estímulo térmico. Cada coluna representa a média \pm E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao respectivo grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.4 Atividade Anti-inflamatória

5.4.1 Edema de pata em rato

No edema de pata induzido por carragenina o pré-tratamento dos animais com o EE da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 e 400 mg/kg) não foi capaz de inibir a formação do edema quando comparado ao grupo controle (Figura 7). Entretanto, o pré-tratamento de ratos com o AAS (300 mg/kg, v.o, 1 h antes) inibiu significativamente a resposta edematogênica provocada pela carragenina nos tempos de 2, 3 ($P < 0,05$) e 4 h ($P < 0,01$) (Figura 7).

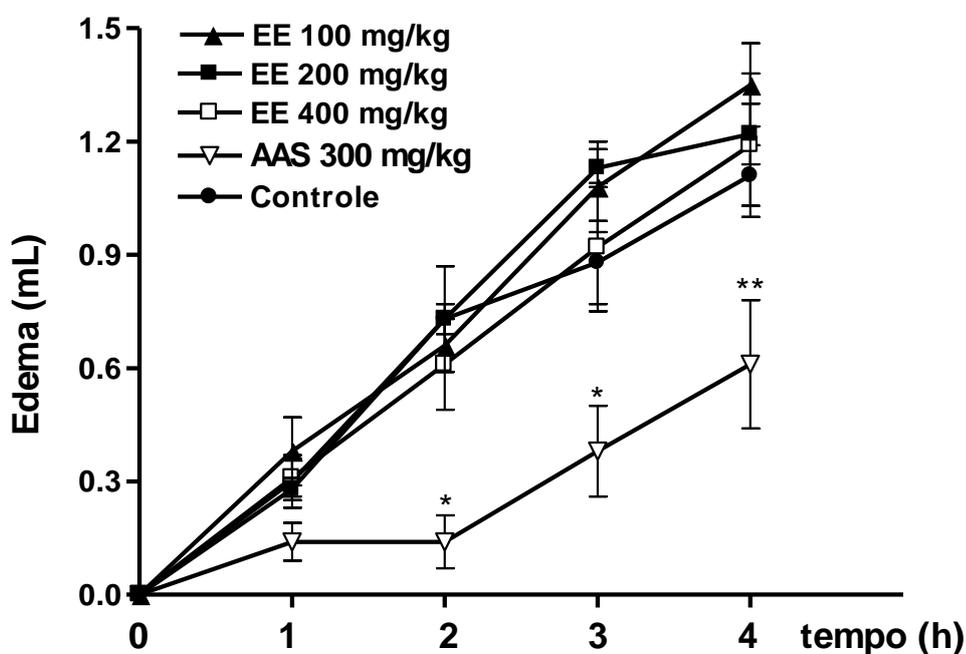


Figura 7: Curva tempo-resposta do EE da entrecasca da *M. rigida* sobre o edema de pata em rato induzido pela carragenina. Grupos de ratos foram pré-tratados com veículo (grupo controle, 10 mL/kg, v.o.), ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg, v.o.) ou EE da *M. rigida* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (v.o.), 60 min antes do edema de pata induzido por carragenina. Medidas foram realizadas nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção s.pl. de carragenina (1%, 100 μ L). Cada valor representa a média \pm E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ /grupo).

A ASC média encontrada em ratos tratados com carragenina foi de $2,47 \pm 0,32$ mL x h ($n=6$). Baseado nos valores da ASC, o AAS (300 mg/kg, $n = 6$) causou inibição de 60,7% ($P < 0,001$) (Figura 8).

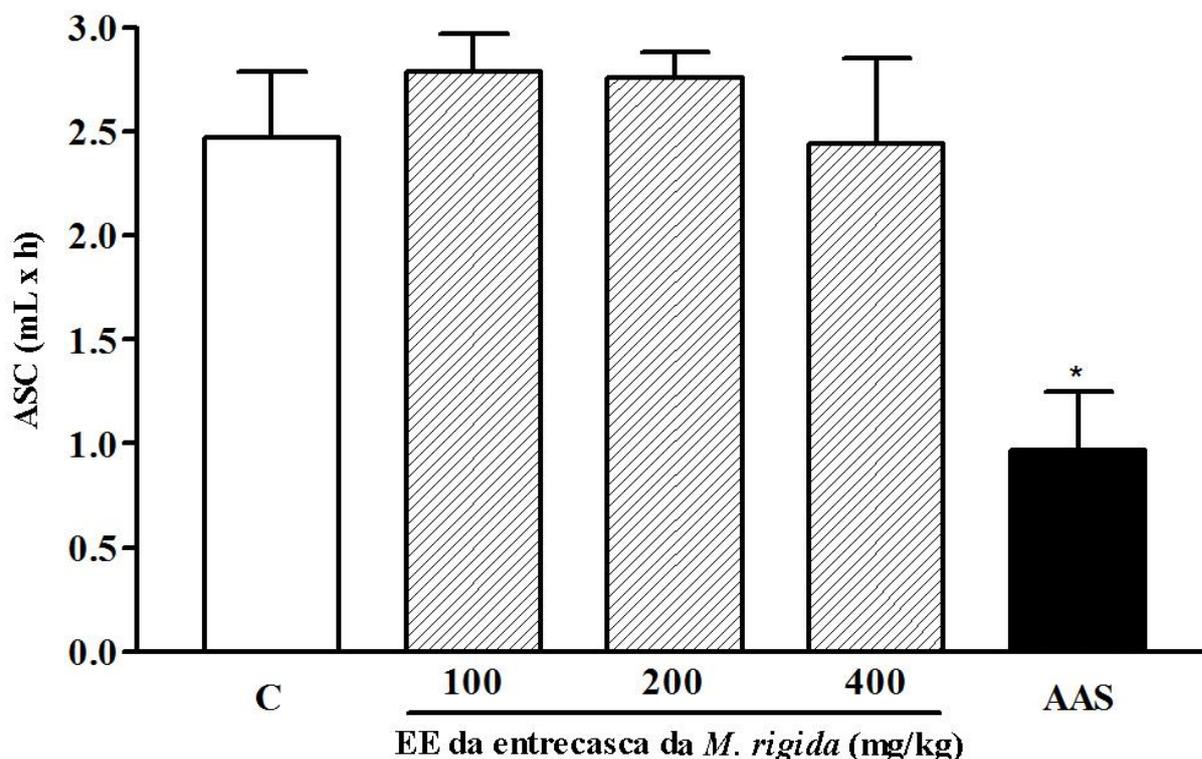


Figura 8: Efeito do EE da entrecasca da *M. rigida* sobre o edema de pata em rato induzido pela carragenina após 4 h. Grupos de ratos foram pré-tratados com veículo (C, grupo controle, 10 mL/kg, v.o.), ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg, v.o.) ou EE da entrecasca da *M. rigida* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (v.o.), 60 min antes do edema de pata induzido por carragenina (1%, 100 μ L). Medidas foram realizadas nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção s.pl. de carragenina, e a ASC calculada no período de 0 a 4 h. Cada valor representa a média \pm E.P.M. O asterisco denota diferença estatística, * $P < 0,01$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.4.2 Peritonite induzida por carragenina em ratos

No modelo de peritonite induzida por carragenina os animais que foram pré-tratados com EE da entrecasca da *M. rigida* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (v.o.) apresentaram uma diminuição significativa na migração de leucócitos de 23,4, 22,7 ($P < 0,01$) e 42,9% ($P < 0,001$), respectivamente, quando comparada com o grupo controle, demonstrando inibição no

processo inflamatório (Figura 9). A droga padrão dexametasona (2 mg/kg, $n = 6$) inibiu em 61,7% ($P < 0,001$) a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (Figura 9).

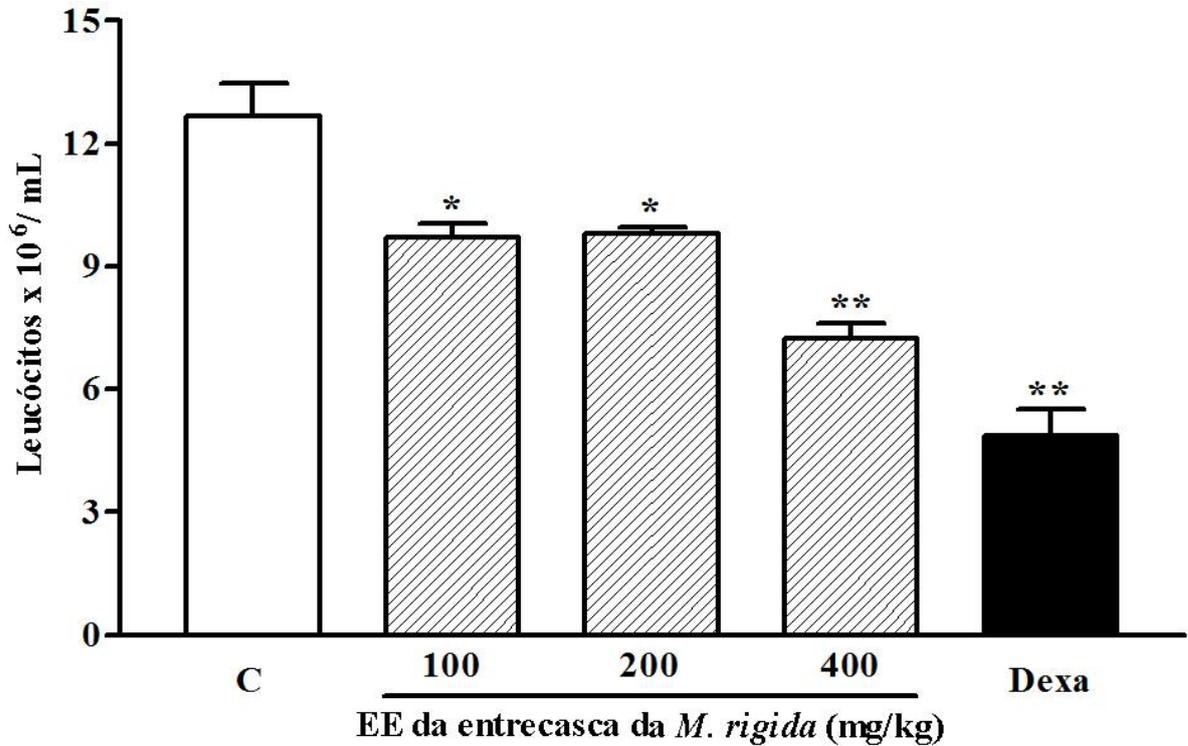


Figura 9: Efeito do EE da entrecasca da *M. rigida* na atividade anti-inflamatória em ratos avaliado no modelo de peritonite induzida por carragenina. Os grupos de ratos foram pré-tratados com o EE da entrecasca da *M. rigida* (100, 200 ou 400 mg/kg, $n = 6$) foi administrado por v.o. 60 min antes da injeção da carragenina a 1%. Outro grupo de animais recebeu dexametasona (dexa, 2 mg/kg, s.c., $n = 6$, controle positivo) ou veículo (v.o., $n = 6$, controle negativo) 60 min antes do agente inflamatório. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,01$ e ** $P < 0,001$, em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a planta *M. rigida*, utilizada popularmente no combate à dor e à inflamação, foi avaliada em três diferentes modelos de nocicepção (contorções abdominais, testes da placa quente e da formalina) e em dois modelos de inflamação (edema de pata e peritonite induzidos por carragenina), além da atividade antioxidante.

Para avaliar a atividade antinociceptiva utilizou-se inicialmente o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, um modelo utilizado para avaliar o potencial analgésico de drogas. Este estudo demonstrou que o EE da entrecasca da *M. rigida*, quando administrado por via oral, foi capaz de produzir de forma significativa efeito antinociceptivo neste modelo experimental. Este método é sensível aos AINEs e a narcóticos, e outras drogas de ação central (SANTOS; VEDANA; FREITAS, 1998; REICHERT et al., 2001). Nossos resultados confirmaram estudos prévios da literatura, onde demonstramos que o AAS causa significativa inibição da nocicepção induzida pelo ácido acético.

A literatura sugere que o ácido acético atua indiretamente, causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da nocicepção, incluindo a BK, serotonina, histamina e prostaglandinas (PGs) que estimulam os neurônios nociceptores (LEI et al., 2008). Ribeiro et al. (2000) demonstraram que a atividade nociceptiva do ácido acético pode ser devido à liberação de citocinas, como IL-1 β , TNF- α e IL-8, a partir de macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal e, em conjunto com outros mediadores, podem induzir à nocicepção, característica observada nesse modelo. Portanto, os resultados apresentados em estudos prévios e em nossos achados podem indicar que a ação antinociceptiva do EE da entrecasca da *M. rigida* nas contorções abdominais induzidas por ácido acético pode ser devido, ao menos em parte, à inibição da liberação de citocinas, como IL-1 β , TNF- α , IL-8 e da COX por células peritoneais residentes. Entretanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar esta hipótese.

O teste da formalina, outro modelo experimental para avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias, é um modelo sensível para várias classes de drogas analgésicas. Este teste consiste em duas fases diferentes que são separadas por tempo: a primeira fase (neurogênica), resultante da estimulação química direta dos nociceptores, e a

segunda fase (nocicepção inflamatória), dependente da inflamação periférica e alterações no processamento central da dor (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992). Portanto, o teste pode ser usado para esclarecer o mecanismo de um possível efeito antinociceptivo de um analgésico proposto (TJOLSEN et al., 1992). A literatura mostra que os AINEs, tais como aspirina, acetaminofeno e diclofenaco, conhecidos por inibir a atividade da enzima COX, são ineficientes ou causam pequena inibição na primeira-fase do teste de formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SANTOS; VEDANA; FREITAS, 1998). Entretanto, os AINEs podem atenuar, de maneira dose-dependente, a segunda-fase da nocicepção induzida pela formalina (SANTOS; VEDANA; FREITAS, 1998).

Os resultados do nosso estudo mostram que o EE da entrecasca da *M. rigida* quando administrado por via oral foi capaz de inibir tanto a primeira-fase quanto à segunda-fase da nocicepção induzida pela formalina em camundongos, semelhante à morfina. Morfina e drogas opióides exercem suas atividades antinociceptiva atuando em receptores (μ , κ e δ) e, assim, modulando a transmissão do estímulo, sem interferir na causa. Estes dados, em conjunto, sugerem que o EE da entrecasca da *M. rigida* possa produzir uma ação antinociceptiva através de participação de receptores opióides e/ou inibição da COX e, conseqüentemente, da síntese de PGs. Entretanto, a possibilidade deste extrato estar agindo via receptores opióides e/ou COX precisa ser testada em experimentos futuros.

O EE da entrecasca da *M. rigida* inibiu a nocicepção causada no teste da placa quente, o que indica, ao menos em parte, o efeito antinociceptivo, decorrente da atuação deste extrato ao nível de sistema nervoso central. Estes resultados corroboram com os resultados de Dias et al. (2007) que demonstraram que o EE da entrecasca da *M. rigida* aumentou de forma significativa o tempo de latência no teste de *tail-flick*. O teste da placa quente é um teste seletivo para detecção de substâncias analgésicas com efeito central, incluindo sedativos e relaxantes musculares ou psicotomiméticos (EDDY; LEIMBACH, 1953; ANKIER, 1974).

Com o objetivo de comprovar a atividade anti-inflamatória do EE da entrecasca da *M. rigida* foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Este é um modelo animal amplamente utilizado para a seleção de compostos anti-inflamatórios e tem sido frequentemente utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico de produtos naturais. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado extraído das algas marinhas, é usada como estímulo inflamatório (diluída em 1-2 %) em modelos animais para testar substâncias, provocando inchaço e dor (COSTA et al., 2004). Sua administração na pata promove uma resposta bifásica, com formação de edema e rápida liberação de vários mediadores inflamatórios como

a histamina, serotonina e BK (primeira fase), que posteriormente é sustentada pela liberação de PGs e óxido nítrico (NO) (segunda fase) produzida pelas isoformas induzível das enzimas COX (COX-2) e NO sintase (iNOS), respectivamente, com pico em 3 h, produzida por isoformas da COX (COX-2) e NO sintase (iNOS), respectivamente (SEIBERT et al., 1994; NANTEL et al., 1999). No presente estudo, observou-se que todas as doses utilizadas do EE da entrecasca da *M. rigida*, quando administradas por via oral, não foram capazes de apresentar atividade antiedematogênica em ratos. Entretanto, Santos et al. (2007) demonstraram que o EE da entrecasca da *M. rigida*, administrado por via oral nas doses de 250 a 750 mg/kg, inibiu a formação de edema induzido pela carragenina. Isto confirma que as ações biológicas dos extratos de plantas dependem da dose empregada e do período e local de coleta.

A carragenina promove uma resposta inflamatória, associada à infiltração de neutrófilos e à produção de radicais livres derivados de neutrófilos, tais como peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e hidroxila, bem como à liberação de outros mediadores derivados de neutrófilos (DAWSON et al., 1991). A inflamação induzida por carragenina envolve a migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, tais como NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (SALVEMINI et al., 1996; LORAM et al., 2007). Estes mediadores são capazes de recrutar leucócitos, tais como neutrófilos, em vários modelos experimentais. No modelo de peritonite induzida pela carragenina em ratos, observou-se que o tratamento oral com todas as doses utilizadas do EE da entrecasca da *M. rigida* inibiu a migração de leucócitos induzida pela injeção i.p. de carragenina, de forma similar à dexametasona, uma droga anti-inflamatória esteroideal. A dexametasona e outros glicocorticóides inibem a liberação de mediadores inflamatórios de várias células, em particular de leucócitos, mastócitos, plaquetas, células endoteliais e macrófagos residentes, além de serem potentes inibidores da enzima iNOS (KLIMENKO; PAVLOVA, 1999).

O EE da entrecasca da *M. rigida* também apresentou potencial antioxidante demonstrado pelo método de DPPH. A capacidade antioxidante de vários metabólitos secundários confere um potencial terapêutico com atividades antinociceptiva e anti-inflamatória (LI et al., 2002). Tem sido demonstrado que os flavonóides e taninos são capazes de inibir as isoformas induzíveis das enzimas COX e/ou NOS, bem como outros mediadores do processo inflamatório (CARVALHO, 2004). Portanto, podemos sugerir que o EE da entrecasca da *M. rigida* pode estar agindo, ao menos em parte, devido à presença destes metabólitos e a sua ação antioxidante. Entretanto, esses dados precisam de confirmação.

Em resumo, demonstrou-se neste estudo que o EE da entrecasca da *M. rigida* apresenta atividades antinociceptiva central e periférica, anti-inflamatória e antioxidante,

validando o uso popular desta planta para tratar processos dolorosos e inflamatórios.

7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados neste trabalho, cujo objetivo central foi avaliar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do EE da entrecasca da *M. rigida*, podemos considerar que as atividades biológicas (antinociceptiva e anti-inflamatória) estão relacionadas, ao menos em parte, a sua atividade antioxidante. Tais resultados possibilitam reais condições para que esta planta possa ser uma fonte abundante de compostos ativos, cuja pesquisa aprofundada poderá levar à descoberta de uma nova e melhor alternativa terapêutica aos estados patológicos com quadro inflamatório agudo, e futuramente, até para doenças inflamatórias crônicas debilitantes. Entretanto, devem ser realizados experimentos adicionais para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades anti-inflamatória e antinociceptiva, bem como estudos de toxicidade e segurança para o uso.

8 REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 114-140, 2007.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.

ANDRADE-LIMA, D. et al. Reconhecimento preliminar das diversas fácies da caatinga do noroeste do Estado de Sergipe. **Revista da Universidade Federal de Sergipe**, v. 1, p. 115-120, 1979.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

ANKIER, S. I. New hot plate test to quantify antinociceptive and narcotic-antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**, v. 27, p.1-4, 1974.

BJORKMAN, D. J. Nosteroidal anti-inflammatory drug induced gastrointestinal injury. **The American Journal of Medicine**, v. 101, p. 25-32, 1996.

BASTOS, L. F. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, n. 1-3, p.171-179, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Medicamentos**. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios, n. 25). Brasília: MS, 2001a. Disponível em: <www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/pnm.pdf>. Acesso em: 09 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006a. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União (03/05/2006). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 25 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006b. 60 p.

BURITOVA, J. et al. Enhance effects of co-administered dexamethasone and diclofenac on inflammatory pain processing and associated spinal c-Fos expression in rat. **Journal of Pain**, v. 64, p. 559-568, 1996.

CALIXTO, J. B. Biopirataria. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 28, p. 36-43, 2000a.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000b.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, 2004, p.49-68.

CASTRO, H. G. et al. **Contribuição ao estudo de plantas medicinais: metabólitos secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco, 2004.113p.

CHEN, J. H.; HO, C. T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 45, n. 7, p. 2374 - 2378, 1997.

CORRÊA, A. G.; Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. **Química Nova**, v.18, n. 5, p. 460-467, 1995.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. 1023p.

COSTA, B. et al. Oral anti-inflammatory activity of cannabidiol, a non-psychoactive constituent of cannabis, in acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw. **Naunyn Schmiedebergs Archives Pharmacology**, v. 369, p. 294-299, 2004.

DAWSON, J. et al. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. **International Journal Tissue React**, v.13, p.171-185, 1991.

DELEO, J. A. Basic science of pain. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 88, p. 58-62, 2006.

DELEO, J. A.; WINKELSTEIN, B. A. Physiology of Chronic Spinal Pain Syndromes: From Animal Models to Biomechanics. **Spine**, v. 27, n. 22, p. 2526-2537, 2002.

DE SOUZA, N. J. Industrial development of traditional drugs: The forskolin example a mini-review. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 167-175. 1993.

DIAS, K. S. et al. Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark. **Fitoterapia**, v. 78, p. 460-464. 2007.

DI VAIO; M. A. V.; FREITAS, A. C. C. Inflamação, Tratamento e Avanços Recentes na Terapia de Doenças Inflamatórias. **Ciência Biológica Saúde**, v. 2, n. 1, p. 360-370, 2001.

DUARTE, J. et al. Vasodilatory effects of flavonoids in rat acetic smooth muscle. Structure-activity relationships. **General Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 857-862, 1993.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Journal of Pain**, v. 492, p. 161-174, 1977.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic Analgesics: II-Dithienylbutenyli and Dithienylbutylamines. **Journal Pharmacology**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EDWARDS, P. J.; WRATTEN, S. D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. [tradução.Vera Lúcia Imperatriz Fonseca]. EPU, São Paulo. 1981.

FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e Controle da Dor. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, 2002. p. 323-334.

GARCIA LEME, L. et al. Pharmacological analysis of local the acute inflammatory process induced in the rat's paw by localinjection of carrageeni and by heating. **British Journal of Pharmacology**, v. 48, p. 88-96, 1993.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogman, 1997. 1436 p.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M, A.; BORIN, M. R. **Biodiversidade um Enfoque Químio-biológico**. Rio de Janeiro: Editora UERJ. 1996. p. 267.

GUYOT, M. M. Perspectivas de la fitoterapia. **Acta Farmaceutica Bonoerence**, v. 9, n. 2, p. 131-138, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavanoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, p. 845-850, 1994.

HARRIS, J. M.; SPENCER, P. S. J. A. Modified Plethysmographic Apparatus for Recording Volume Changes in the Rat Paw. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.14, p.464-466, 1962.

HEIDLAND, A. et al. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**, v. 19, n. 10, p.102-109, 2006.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79.

HOLDEN, J. E.; JEONG, Y.; FORREST, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **AACN Clinical Issues**, v. 16, p. 291-301, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. Série de textos da escola de verão em Química. São Carlos: UFSCar: 2003, 152p.

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

IELPO, M. T. L.; DE SOLE, P.; BASILE A.; MOSCATIELLO, V.; LAGHI, E.; COBIANCHI, R. C.; VUOTTO, M. L. Antioxidant properties of *Lunularia cruciata* (Bryophyta) extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 555-566, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica - Introdução à Taxonomia Vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

KAMCHONWONGPAISON, S.; MESHNICK, S. R. The mode of action the antimalarial artemisinin and its derivatives. **General Pharmacology**, v. 27, p. 587-592, 1996.

KATZUNG, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 8.ed. International Edition. Lang Medical Books/Mc Graw- Hill, 2000.

KIMURA, E. et al. Effect of *Maytenus aquifolium* extract on the pharmacokinetic and antiinflammatory effectiveness of piroxicam in rats. **Phytomedicine**, v.7, p. 117-121, 2000.

KINGSTON, D. J. I. The chemistry of taxol. **Pharmacology Therapeutics**, v. 52, p. 1-34, 1991.

KLIMENKO, N. A.; PAVLOVA, E. A. Role of Leukocytes in Increased Vascular Permeability in Inflammation. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 128, n. 8, p.800-802, 1999.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc**, v.18, p.412-416, 1959.

LEE, Y.; LEE, C.H.; HO,U. Painful channels in sensory neurons. **Molecular and Cells**, v. 20, n. 3, p. 315-324, 2005.

LEI G. et al. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumourstatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 1, p. 10-16, 2008.

LI, D. W. et al. Activity guided isolation of saponins from *Kalopanax pictus* with anti-inflammatory activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n.7, p. 900-903, 2002.

LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Journal of Pain**, v. 8, 127-136, 2007.

LOURENZANI, A. E. S. LOURENZANI, W. L. BATALHA, M. O. Barreiras e Oportunidades na Comercialização de Plantas Mediciniais provenientes da Agricultura Familiar. *Informações Econômicas*, SP, v.34, n.3, mar. 2004. Disponível em:<<http://www.gepai.dep.ufscar.br/publicacoesbusca.php?buscanome=M%C3%A1rio%20t%C3%A1vio%20Batalha#gepai>>. Acesso em: 03 maio 2008.

LYSS, G. et al. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from Arnica, selectively inhibits transcription factor NF- B. **Biological Chemistry**, v. 378, p.951-961, 1997.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr. Plantas Mediciniais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438. 2002.

MANACH, C. et al. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 12, p.1259-1266, 1998.

MARKENSOS, J. A. Mechanisms of chronic pain. **The American journal of medicine**, v.101, p.6-18, 1996.

MARTÍNEZ, M. J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 171–174. 1996.

MARTIUS, C. F. P. **Flora Brasiliensis**. Munchen, Wien, Leipzig, 15 vols. 1840.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 2 ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141p.

MATU, E. N.; VAN STADEN, J. Antibacterial and antiinflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 35–41, 2003.

MAYER, S. et al. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. **Pain**, 130, p. 14–24, 2007.

MIGUEL, D. M.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterapia**. São Paulo: Robe, 1999.116p.

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

MOTA, C. N.; ALBUQUERQUE, U. P. **As Muitas fases da Jurema: De espécie botânica à divindade afro-indígena**. Recife: Edições Bagaço, 2002.

NANTEL, F. et al. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, 128: 853-859, 1999.

NATALIA, S. C. et al. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 13, n. 3, p.173-178, 2003.

PHILLIPS, W. J.; CURRIER, B .L. Analgesic pharmacology: I Neurophysiology. **Journal of the American Academy Orthopaedic Surgeons**, v. 12, p. 213-220, 2004.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289-297. 1997.

RAO, R. M. et al. Endothelialdependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circulation Research**, v. 101, n. 3, p. 234-247, 2007.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino da farmacognosia, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REICHERT, J. A. et al. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**, v. 89, p. 221-227, 2001.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia. Oportunidades econômicas e sustentáveis**. SEBRAE-INPA, Manaus, Amazonas. 2001.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética Amazônica**. SEBRAE- INPA, Manaus, Amazonas. 2002.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal Pharmacology**, v.387, p.111–118, 2000.

RICE-EVANS, C. A. et al. The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids, **Free Radical Research**, v. 22, n.4, p. 375, 1995.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Colômbia: Premier, 1997. p. 372.

ROBBINS, S. L. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 5 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996.

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

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: A key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v.118, p. 829-838, 1996.

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

SANTOS, A. R. S.; VEDANA E. M. A.; FREITAS G. A. G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v.47, p. 302-307. 1998.

SANTOS, V. L. et al. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 336-342, 2007.

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

SEIBERT, K. et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entre for resoleomics. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 30, p. 69–95, 2004.

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

SILVA, M. C.; CARVALHO, J. C. T. Inflamação: In: J. C. T. Carvalho. **Fitoterápicos – Anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004, 480p.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2008.

SOSA, S. et al. Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid. **Phytomedicine**, v. 14, p. 109–114. 2007.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, p.351-355, 2007.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Journal of Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J, M. **The Pharmacology of Pain**. Springer: Verlag, Berlin. v. 130, p.1 -20, 1997.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING R. C. **Inflamação – Uma revisão do Processo**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: Quintessence Books, 1998. 172p.

VALE, F. M. Dor. Novos aspectos fisiopatológicos e conseqüentes estratégias farmacológicas. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 3, p. 291-304, 2000.

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

VIEIRA, E. S. **A evolução da fitoterapia em 500 anos de Brasil**. Monografia apresentada ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Tiradentes, 2001, 65f.

VOLTARELLI, J. C. Febre e inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n.1, p.7-48, 1994.

WAGNER, H. Search for new plant constituents with potential antiphlogistic and antiallergic activity. **Planta Medica**, v. 55, p. 235-241, 1989.

WALLACE, J. L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy. The second hundred years. **Gastroenterology**, v. 112, p. 1000-1016, 1997.

WHEELWRIGH, E. G. **Medicinal Plants and their History**; Dover Publications; New York, NY, 288pp. 1974.

WIENECKE, T. et al. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, v.139, p. 106-116, 2008.

WINTER, C.A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** v.111, p.544-547, 1962.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 379, n. 2, p.201-210, 1997.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais – sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ZHOU, H. Y. et al. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)- methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, 572, 239-248, 2007.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado “Estudo farmacológico e bioquímico do extrato etanólico e partições da casca da *Maytenus rigida*”, sob coordenação da Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 10/06/2008.

São Cristóvão, 11 de junho de 2008

Prof.ª Dr.ª Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

Cidade Universitária “Prof. Aloísio de Campos”
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE

**Pharmaceutical Biology - Manuscript ID NPHB-2010-0048**

De: pharmbiol@att.net ✉
Para: sarathomazzl@uol.com.br ✉
Assunto: Pharmaceutical Biology - Manuscript ID NPHB-2010-0048
Data: 15/01/2010 03:40

15-Jan-2010

Dear Professor Thomazzi:

Your manuscript entitled "Antinociceptive effect and inhibitory action on the inflammatory leukocyte migration by <i>Maytenus rigida</i> extract" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in *Pharmaceutical Biology*.

Your manuscript ID is NPHB-2010-0048.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/nphb>.

Thank you for submitting your manuscript to *Pharmaceutical Biology*.

Sincerely,
Pharmaceutical Biology Editorial Office

Visit www.informahealthcare.com and sign up for free eTOC alerts to all Informa Pharmaceutical Science journals

⚠ A senha do assinante Uolmail é secreta. Nenhum funcionário do Uolmail está autorizado a solicitá-la. Traga o cartão.