

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS

Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Núcleo de Pós-Graduação em Medicina

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
SECO LIOFILIZADO DA *Remiria maritima* Aubl.**

São Cristóvão

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE - UFS

Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa

Núcleo de Pós-Graduação em Medicina

**Avaliação da atividade biológica do extrato seco liofilizado da *Remirea*
maritima Aubl.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Sergipe,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde, realizada sob a
orientação do Prof. Dr. Adriano
Antunes de Souza Araújo.

São Cristóvão

2010

DANTAS OLIVEIRA / ISAMAR AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO SECO DA *Remiria*
maritima Aubl.

Ficha catalográfica

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central / UFS

Oliveira, Isamar Dantas

Avaliação da Atividade Biológica do Extrato Seco da *Remiria maritima* Aubl.
- São Cristóvão, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo

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

1. *Remiria maritima* Aubl 2. Atividade Biológica

Folha de aprovação

ISAMAR DANTAS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO
SECO DA *Remiria maritima* Aubl.

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

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. ADRIANO ANTUNES DE SOUZA ARAÚJO

Profa. Dra. FRANCILENE AMARAL DA SILVA
1º Examinador:

Prof. Dra. JULIANA CORDEIRO CARDOSO

2º Examinador:

PARECER

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo
André e ao meu adorável filho
André Felipe pela
compreensão de todas as minhas
ausências.*

AGRADECIMENTOS

AGRADEÇO a DEUS, minha fonte de forças.

Ao meu orientador Prof. Dr. Adriano Antunes pelos ensinamentos, paciência e compreensão e acima de tudo pela oportunidade concedida. MUITO OBRIGADA!

Aos meus co-Orientadores Prof. Dra. Rita de Cássia Trindade , ao Prof. Dr. Lucindo Quintans Junior pelas contribuições no delineamento dos experimentos e na organização dos resultados e sugestões.

A Prof. Dra. Ana Paula Prata por identificar a espécie botânica estudada e por sugestões fornecidas.

Aos professores Francilene Amaral da Silva e Leonardo Rigoldi Bonjardim pela colaboração nas correções desse trabalho.

Aos professores do Curso de Mestrado em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos prestados durante as disciplinas.

A Julina , Patricia e Antônio alunos do Laboratório de Microbiologia da UFS pela disponibilidade e ajuda sempre que precisei.

As minhas mais novas amigas Adriana Gibara e Geovana do Laboratório LAPEC pela paciência e grande ajuda . Que DEUS as abençoe .

Aos amigos do laboratório LEFT pela ajuda e em especial a Mônica, João Paulo e Gabrielle Mendes que me ajudaram bastante.

A minha eterna e grande amiga Marcélia Melo por ter me fortalecido em momentos de desânimo com sua amizade e conselhos.

A todos aqueles que de algum modo, me influenciaram positivamente durante este período, todo o meu reconhecimento.

A Universidade Tiradentes - Unit, por me proporcionar desde sempre uma formação.

" A carreira profissional, os títulos acadêmicos, e o dinheiro só terão valor se houver harmonia na família, afinidade entre os amigos, serenidade no amor e principalmente paz de espírito".

Martin Luther King

RESUMO

Remiria marítima Aubl., popularmente conhecida como “Capim da praia” é utilizada na forma de chás para o tratamento de diarreia, doenças renais, febre alta e como analgésico e anti-inflamatório. Não há na literatura registros a respeito de suas propriedades biológicas. Portanto, este estudo foi desenvolvido visando avaliar a ação dos possíveis efeitos antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso liofilizado da *Remiria marítima* Aubl. (ERMA) utilizando ensaios *in vivo* e *in vitro*. O extrato foi submetido primeiramente aos ensaios fitoquímicos. A atividade antimicrobiana foi avaliada *in vitro* pela técnica do método de disco difusão e concentração inibitória mínima. O efeito antioxidante foi verificado *in vitro* através do teste de medida da lipoperoxidação (TBARS), óxido nítrico (NO) e capacidade *scavenger* de radical hidroxila onde as concentrações do ERMA utilizadas foram 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1 mg/mL. A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético a 0,9% e da formalina 1%. O teste da placa quente foi realizado para avaliar possível ação central do ERMA. O teste da coordenação motora foi utilizado para avaliar possíveis efeitos miorrelaxantes e sedativos do ERMA que pudessem interferir nos efeitos antinociceptivos. A atividade anti-inflamatória foi avaliada através do teste da peritonite induzida por carragenina a 1%. Os animais (n = 6/grupo) foram tratados 30 min antes de cada experimento, com o veículo (salina + tween 80 0,2%; i.p.) ou ERMA (100, 200 e 400 mg/kg; i.p.). A triagem fitoquímica mostrou a presença de diversas classes químicas: fenóis, taninos condensados, alcalóides, cumarinas voláteis, flavonóides, saponinas e triterpenos. O ERMA demonstrou ação antimicrobiana frente as bactérias Gram-positivas e negativas. Adicionalmente, na avaliação da atividade antioxidante, no teste TBARS, houve uma redução da lipoperoxidação ($p < 0,001$). No teste do NO, houve redução na formação de óxido nítrico ($p < 0,001$). No teste para avaliar a capacidade *scavenger* de radical hidroxila foi significativo com ($p < 0,001$). O tratamento com ERMA via intraperitonal produziu uma redução significativa do número de contorções abdominais 100 ($26,0 \pm 2,1$; $p < 0,01$), 200 ($25,1 \pm 2,4$; $p < 0,01$) e 400 mg/kg ($19,3 \pm 2,9$; $p < 0,001$). No teste da formalina, houve uma redução da resposta álgica de maneira significativa apenas na segunda fase, 200 mg/kg ($22,9 \pm 2,9$; $p < 0,05$) e 400 mg/kg ($15,3 \pm 3,9$; $p < 0,001$). No teste da placa quente não houve diferença significativa no comportamento nociceptivo. No teste do Rota rod foi verificado que o ERMA não altera a coordenação motora dos animais. No teste da peritonite, o tratamento com ERMA promoveu uma redução significativa na migração dos leucócitos induzida pela carragenina em todas as doses 100 ($8,9 \pm 0,1$; $p < 0,01$), 200 ($6,6 \pm 0,2$; $p < 0,01$) e 400 mg/kg ($3,9 \pm 0,6$; $p < 0,01$). Os resultados sugerem que o ERMA possui efeito antimicrobiano, antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório. Entretanto, novos estudos são requeridos para uma melhor avaliação e caracterização dos mecanismos envolvidos nesses efeitos.

Palavras-chave: *Remiria marítima* Aubl.; Capim da praia; Propriedades biológicas; Ensaios fitoquímicos.

OLIVEIRA, I. D. ASSESSMENT OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACT DRY lyophilized *Remiria maritima* Aubl. Federal University of Sergipe. Nucleus in post-graduation in Medicine, 2010.

ABSTRACT

Remiria maritime Aubl., popularly known as "capim da praia" is used as teas to treat diarrhea, kidney disease, high fever and analgesic and antiinflammatory. There are no records in the literature about its biological properties. Therefore, this study was designed to evaluate the possible action of the antimicrobial effects, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory effect of aqueous extract of dried sea *Remiria* Aubl. (ERMA) using tests in vivo and in vitro. The extract was first subjected to tests phytochemicals. Antimicrobial activity was evaluated in vitro by the technique of disk diffusion method and minimum inhibitory concentration. The antioxidant effect was observed in vitro by testing the extent of lipid peroxidation (TBARS), nitric oxide (NO) and hydroxyl radical scavenger capacity where ERMA concentrations used were 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1 mg/mL. The antinociceptive activity was evaluated by testing the writhing induced by acetic acid 0.9% and 1% formalin. The test of motor coordination was used to assess possible effects of muscle relaxants and sedatives ERMA might interfere with the antinociceptive effects. The anti-inflammatory activity was evaluated by testing peritonitis induced by carrageenan 1%. The animals (n = 6/group) were treated 30 min before each experiment, vehicle (saline + 0.2% Tween 80, ip) or ERMA (100, 200 and 400 mg / kg, ip). The phytochemical screening showed the presence of several chemical classes: phenols, tannins, alkaloids, volatile coumarins, flavonoids, saponins and triterpenes. The ERMA demonstrated antimicrobial activity against Gram-positive and negative. Additionally, evaluation of antioxidant activity in the TBARS assay, there was a reduction of lipid peroxidation (p <0.001). In the test of NO reduction occurred in the formation of nitric oxide (p <0.001). In the test to assess the ability of hydroxyl radical scavenger was significant with (p <0.001). Treatment with ERMA intraperitoneally produced a significant decrease in the number of writhing 100 (26.0 ± 2.1, p <0.01), 200 (25.1 ± 2.4, p <0.01) and 400 mg / kg (19.3 ± 2.9, p <0.001). In the formalin test, there was a reduced response Algic significantly only in the second phase, 200 mg / kg (22.9 ± 2.9, p <0.05) and 400 mg / kg (15.3 ± 3, 9, p <0.001). In the hot plate there was no significant difference in nociceptive behavior. In Rota rod test was verified that the ERMA does not alter the motor coordination of animals. In the test of peritonitis, treatment with ERMA promoted a significant reduction in leukocyte migration induced by carrageenan at all doses 100 (8.9 ± 0.1, p <0.01), 200 (6.6 ± 0.2 p <0.01) and 400 mg / kg (3.9 ± 0.6, p <0.01) . The results suggest that ERMA has antimicrobial activity, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory. However, further studies are required to better assess and characterize the mechanisms involved in these effects.

Keywords: *Remiria maritima* Aubl.; capim da praia; Biological properties; Phytochemical tests.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Imagem da planta <i>Remiria marítima</i> Aubl	14
FIGURA 2	Comparação do inóculo com a escala de Mac Farland	34
FIGURA 3	Método da difusão em Agar – técnica do poço	35
FIGURA 4	Fluxograma do Método de Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Agar- técnica do poço	36
FIGURA 5	Placa de Microtitulação para CIM	37
FIGURA 6	Alterações comportamentais caracterizadas por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores.	41
FIGURA 7	Alterações comportamentais caracterizadas pelo tempo do número de lambidas de pata.	42
FIGURA 8	Aparelho Rota rod	43
FIGURA 9	Atividade Antioxidante do ERMA frente ao TBARS	52
FIGURA 10	Atividade Antioxidante do ERMA frente ao óxido nítrico	52
FIGURA 11	Capacidade <i>scavenger</i> de radical hidroxila pelo ERMA	54
FIGURA 12	Efeito do ERMA no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.	55
FIGURA 13	Efeito do ERMA no modelo de nocicepção induzido pela formalina.	57
FIGURA 14	Efeito do ERMA no comportamento nociceptivo no teste da placa quente	58
FIGURA 15	Efeito do ERMA no Teste da coordenação motora.	59
FIGURA 16	Efeito do ERMA na inflamação aguda induzida por Carragenina	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Triagem fitoquímica do extrato seco da <i>Remirea maritima</i> Aubl.	45
TABELA 2	Determinação da atividade antimicrobiana de difusão em poços, concentração inibitória mínima do ERMA frente bactérias Gram– positivas	47
TABELA 3	Determinação da atividade antimicrobiana de difusão em poços, concentração inibitória mínima do ERMA frente bactérias Gram– negativas	48
TABELA 4	Determinação da atividade bactericida mínima do ERMA contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	50

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

AAPH	2,2-azobis[2-metilpropionamidina] dihidroclreto
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroides
CHCl ₃	Triclorometano
CIM	Concentração inibitória mínima
CMM	Concentração microbicida mínima
Dexa	Dexametasona
DRG	Gânglios da raiz dorsal
DZ	Diazepam
ERMA	Extrato da <i>Remiria maritima</i> Aubl.
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FeCl ₃	Cloreto de ferro
FeSO ₄	Sulfato ferroso
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HO•	Radical Hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p.	via de administração intraperitoneal
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
Mg ⁺⁺	Magnésio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

NGF	Fator de crescimento neural
NO	Oxido Nitrico
$O_2^{\bullet-}$	Radical Ânion Superóxido
O_2	Oxigênio Molecular
OMS	Organização Mundial da Saúde
$\bullet OH$	Radical Hidroxila
PG	Prostaglandina
SNP	Nitroprussiato de sódio
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS

Resumo	I
Abstract	II
Introdução	9
2. Revisão da Literatura	12
2.1 Plantas medicinais	12
2.2. <i>Remirea maritima</i> Aubl.	14
2.3. Agentes antimicrobianos e sitio de ação antimicrobiana	15
2.4. Ação antioxidante	19
2.5. Nocicepção e Inflamação	22
3. Objetivos	29
4. Material e Métodos	30
4.3. Triagem fitoquímica	31
4.4. Atividade biológica	33
4.4 .1. Atividade antimicrobiana	33
4.4.2. Atividade antioxidante	38
4.6 Avaliação Farmacológica	40
4.4.3.1. Animais	40
4.6.2. Atividade antinociceptiva e antiinflamatória	40
5. Análise Estatística	44
6. Resultados e Discussão	45
7. Conclusões	62
8. Considerações e Perspectivas	63
9. Referências	64
Anexo 1	81
Anexo 2	82

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas como fonte geradora de produtos para o tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana, remonta à idade antiga. Desde essa época elas eram empregadas na alimentação, em práticas religiosas, no folclore e na medicina onde registros médicos comprovam que os chineses já utilizavam as plantas medicinais desde 3700 a.C. e acreditavam que havia uma planta apropriada para o tratamento de cada doença (TANG et al., 2004; CARBONARI, 2006).

Plantas medicinais são aquelas que possuem em sua composição substâncias, biologicamente sintetizadas a partir de nutrientes, água e luz. Estas substâncias provocam no organismo humano e animal, reações que podem variar entre a cura ou abrandamento de doenças e apresentam geralmente em sua composição química uma variedade de compostos ativos como fitoesteróis, fitoestrogênios, triterpenos (livres ou estereificados a ácidos graxos), lecitinas, lignanas e flavonóides. Esses compostos possuem atividade anti-androgênica, antiinflamatória, além de inibir a proliferação celular, sendo que o efeito destes extratos possivelmente não está relacionado a um único componente ativo e sim ao efeito sinérgico de seus componentes (LORENZI, MATOS, 2005).

A maior parte das práticas terapêuticas tradicionais ou alternativas envolve o uso de extratos de plantas medicinais. Por volta de 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o valor dessas plantas, considerando os promissores e consagrados resultados da medicina tradicional chinesa, estimou também em um bilhão o número de pessoas vivendo em pobreza absoluta e que cerca de 85% da população mundial depende essencialmente da medicina tradicional para o atendimento de suas necessidades básicas de saúde (YUNES, CALIXTO, 2001).

O Brasil possui sérios problemas de saúde pública, principalmente na região Nordeste em razão do baixo poder aquisitivo de grande parte da população local. O alto custo dos medicamentos torna-os muitas vezes inacessíveis até mesmo nos mais simples casos, como dores agudas e/ou crônicas, febres e gripes. Portanto, o uso popular das plantas medicinais torna-se o primeiro passo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de baixo custo para uma região tão carente de recursos financeiros e, por outro lado, tão rica em flora, reunindo milhares de espécies vegetais distintas (SERPELONI et al., 2008).

Entretanto, o uso popular e tradicional, não são suficientes para validar etnofarmacologicamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros chegando muitas vezes às mãos do usuário despojada de qualquer informação fidedigna (CALIXTO, 2000).

No entanto, apesar das dificuldades, como desconhecimento da época da coleta, do especialista que a colheu, dos cuidados tomados durante os processos de armazenamento, secagem e moagem, da ausência de contaminação por fungos e outros microrganismos, além da toxicidade, há um consenso mundial da necessidade de se estabelecer métodos e parâmetros que permitam avaliar a qualidade das matérias-primas vegetais e, é nesse sentido, que várias diretrizes relacionadas às boas práticas agronômicas, controle de qualidade e registro de produtos de origem vegetal vem sendo publicados (CALIXTO, 2000).

Poucas são as espécies vegetais que apresentam na literatura especificações para avaliar a qualidade da matéria-prima, bem como registro de métodos analíticos validados que possam ser utilizados para a quantificação de marcadores químicos, o que é fundamental para garantia da eficácia e segurança dos produtos derivados. Na verdade, considerando a imensa variedade da flora brasileira, poucas são as espécies com atividade biológica comprovada, sendo a maioria utilizada pela população de forma bastante empírica, o que significa um potencial terapêutico ainda a ser descoberto (YUNES, CALIXTO, 2001).

Nesse contexto, as plantas tem atraído o interesse de muitos pesquisadores e da própria indústria farmacêutica por serem capazes de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias, não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção do metabolismo celular, denominadas de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários, embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens adaptativas à sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

Aproximadamente 100 mil compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas já foram descobertos, entretanto somente um pequeno número dessas substâncias com enorme diversidade química é conhecido sob o ponto de vista biológico. Assim, as espécies vegetais continuam a representar fontes de inúmeros fármacos e estudos relacionados à investigação de suas propriedades terapêuticas tornam-se cada vez mais constantes (GONÇALVES, 2008).

Dentre as plantas de uso regional, com possíveis atividades biológicas promissoras destaca-se a *Remirea maritima* Aubl. conhecida como “Salsa da praia” “capim da Praia” essa planta é utilizada popularmente no tratamento da diarreia, e doenças renais, para febre alta, bem como com fins analgésico e antiinflamatório através da preparação de chás (VITTA, PRATA, 2009).

Estudos envolvendo a *Remirea marítima* Aubl. são bastante escassos na literatura atual. Pouco se sabe através da literatura científica sobre os efeitos biológicos dessa planta. Nesse sentido, o presente trabalho teve como interesse principal realizar a triagem fitoquímica do extrato liofilizado, e avaliar possíveis efeitos antimicrobianos, antinociceptivos, antiinflamatórios e antioxidantes utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura científica. A variedade e a complexidade das moléculas que constituem os metabólitos secundários das plantas e organismos marinhos ainda é de difícil caracterização por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (KVIECINSKI, 2008).

Um dos principais aspectos que deve ser observado quando se procura obter substâncias ativas de plantas consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é mais provável encontrar atividade biológica em plantas, quando relacionadas o seu uso na medicina popular que plantas escolhidas aleatoriamente. Aproximadamente 75% dos compostos empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo sugestões da medicina popular (CALIXTO, 2005).

Neste contexto, as plantas medicinais por suas propriedades terapêuticas, adquiriram fundamental importância, por meio do desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, fazendo com que os produtos obtidos a partir de fonte vegetal tornassem objeto de análise científica. A descoberta dos componentes secundários tornou possível o uso dos vegetais como fonte de princípios ativos para uma infinidade de doenças que acometem o homem (SOUZA et al., 2007).

Assim, muitos extratos vegetais vem demonstrando atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, o que justifica a investigação sobre a medicina tradicional que centrou-se na caracterização de diversas atividades biológicas como, por exemplo: bactericida, fungicida, analgésica, sedativa, antiinflamatória, antiespasmódica e anestésica (CARBONARI, 2006).

Dentre as substâncias provenientes de plantas amplamente utilizada na clínica, pode-se exemplificar a pilocarpina, alcalóide isolado de gênero *Pilocarpus* (CARBONARI, 2006), empregado na preparação de fármacos usados no combate ao glaucoma; a capsaicina extraída de *Capsicum* sp.. com ação anestésica; a colchicina extraída da *Colchicum autumnale* com ação anti-reumático, como agentes cardiovasculares citam-se os efeitos benéficos dos extratos da

Digitalis purpurea e *Digitalis lanata* que levaram à descoberta de glicosídeos cardíacos como a digoxina e a digitoxina, antiarrítmicos; a quinidina, isolada da *Cinchona* sp.. e ainda, a reserpina isolada da *Rauwolfia* sp. com potente ação anti-hipertensiva (YUNES, CALIXTO, 2001 ; CHAH et al., 2006).

Na área da oncologia, a contribuição das plantas medicinais pode ser reiterada por exemplo com a citação dos alcalóides vimblastina e vincristina extraídas de *Catharanthus roseus*, utilizadas no tratamento de linfomas e leucemias; o taxol, diterpeno isolado de plantas do gênero *Taxus* que se encontra disponível no mercado farmacêutico e vem demonstrando efeitos positivos em pessoas portadoras de câncer, principalmente de carcinoma ovariano e pulmonar; a camptotecina, alcalóide extraído da *Camptotheca acuminata* (VERPOORTE, 1998; GRABLEY, THIERICKE, 1999; VALGAS, 2007).

Outros agentes que compõem o arsenal terapêutico no combate ao câncer são derivados semi-sintéticos de compostos extraídos das plantas como por exemplo, o docetaxol, derivado do taxol que apresenta maior solubilidade e o dobro da potência do composto natural; irinotecano usado no tratamento do câncer ovariano e cervical; o etoposídeo e tenoposídeo derivados sintéticos da podofilotoxina extraída do rizoma da *Podophyllum peltatum* (VERPOORTE, 1998; FRANÇA, 2006).

Assim, o uso das espécies nativas pode ser uma alternativa econômica para o aproveitamento sustentável da região. Várias são as espécies que possuem utilização regional e muitas delas enquadram-se em mais de um tipo. Entretanto, o usuário ainda é a população regional cuja atividade é essencialmente extrativista (SIMÕES et al., 2007; BARBOSA, 2008).

As potencialidades de uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas, afirmação endossada pelos novos paradigmas de desenvolvimento social e econômico, baseados nos recursos renováveis. Novos conhecimentos e novas necessidades certamente encontrarão, no reino vegetal, soluções, por meio da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou com aplicações tanto na tecnologia farmacêutica quanto no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação (CECHINEL FILHO, 2003; VIEGA JR, PINTO, MACIEL, 2005).

2.2. *Remirea maritima* Aubl.

A *Remirea maritima* Aubl. (Figura 1), pertencente à família Cyperaceae, ordem Gramineae, Classe Monocotyledones (PRATA, LOPEZ, SIMPSON, 2001), é uma planta herbácea, geralmente perene e graminiforme (VITTA, PRATA, 2009). É popularmente conhecida como “campim-da praia”, “salsa da praia” e “rasteira da praia”. Planta dióica de 15 a 30 cm de altura, com tronco de 40 a 100 cm de diâmetro. Folhas subcoriáceas, de 3 a 6 cm de comprimento levemente pubescentes na face inferior sustentadas por pecíolo de 2 a 4 cm de comprimento (VITTA, PRATA, 2009). Planta perenifolia, heliófita, pioneira e praticamente indiferente às condições físicas do solo. É característica da floresta pluvial atlântica que sofreu interferência do homem, sendo pouco comum nas florestas clímaxes e abundante nas capoeiras, sendo utilizada na população principalmente para fins terapêuticos como analgésico e antiinflamatório (VITTA, PRATA, 2009).

Plantas do gênero Cyperaceae estão distribuídas entre 4.500 espécies, das quais 45 gêneros e cerca de 600 a 700 espécies ocorrem no Brasil. Destas, 14 gêneros e 61 espécies ocorrem no estado de Sergipe; sendo conhecidas por apresentarem metabolismo secundário ativo e esse metabolismo tem sido evidenciado pela extensiva pesquisa química, resultando no isolamento de diversas classes de compostos incluindo xantonas, cumarinas, flavonóides, chalconas, benzofuranos, triterpenos, entre outros (VITTA, PRATA, 2009).



Figura 1: *Remirea maritima* Aubl.

2.3. Agentes antimicrobianos e sítio de ação antimicrobiana

O conceito de que substâncias derivadas de um organismo vivo podem exterminar outros (antibiose) é quase tão antigo quanto a ciência da microbiologia. Na verdade, a aplicação da antibioticoterapia, sem que fosse reconhecida como tal, é consideravelmente antiga. Há mais de 2.500 anos, os chineses tinham conhecimento das propriedades terapêuticas da papa mofada do feijão-soja, empregada em antrazes, furúnculo e infecções semelhantes, e usavam-na como tratamento de rotina nestas infecções. Durante muitos séculos a literatura médica registrou descrições dos efeitos benéficos resultantes da aplicação, em certas infecções, de terra e várias plantas, muitas das quais eram provavelmente fontes de fungos e bactérias produtoras de antibióticos (CELLOTO et al., 2003).

O bolor do pão também era utilizado para o tratamento de ferimentos pelos antigos egípcios, porém, ainda não existia nenhum conhecimento sobre o que estes fungos continham (BLACK, 2002).

Alexander Fleming percebeu a capacidade do bolor *Penicillium notatum* em inibir o crescimento bacteriano de *Staphylococcus*. Selman Wasman, em 1944, descobriu a estreptomicina a partir de bactérias do gênero *Streptomyces* e introduziu o termo antibiótico como sendo uma substância química produzida por bactérias ou fungos, com a capacidade de inibir o crescimento ou destruir bactérias. A “sulfa” foi um marco para a medicina, apesar de sua utilização ser limitada nos dias atuais. Após estas descobertas, outros agentes antibacterianos como os aminoglicosídeos, cefalosporinas entre outras foram desenvolvidos (ALVES, 2006).

Os antibióticos são substâncias produzidas por várias espécies de microrganismo que suprimem o crescimento de outros microrganismos e podem destruí-los. Os antibióticos diferem bastante em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, como também em seu espectro antimicrobiano e mecanismo de ação. Muitos foram identificados quimicamente e outros foram sintetizados, aumentando muito o arsenal terapêutico (NASCIMENTO, LOCATELLI, FREITAS, 2000b).

O termo quimioterapia era utilizado para descrever substâncias químicas capazes de destruir microrganismos patogênicos sem causar danos aos seus hospedeiros. Atualmente esta definição foi substituída pelo termo agente antimicrobiano, sendo que o termo quimioterapia é utilizado para qualquer substância química utilizada na prática médica (BLACK, 2002).

Segundo Mims e colaboradores (2001), existem algumas propriedades que devem ser específicas aos antimicrobianos:

- a) toxicidade seletiva (agir nas bactérias sem causar danos ao hospedeiro);
- b) amplo espectro de ação (agir em maior número de microrganismos);
- c) mecanismo de ação conhecido (atuando de maneira diferente na célula alvo, podendo ser em nível de inibição da síntese da parede celular ou na destruição da função da membrana citoplasmática pela inibição da síntese de proteínas ou ainda por agirem como antimetabólito);
- d) não promover resistência bacteriana (não deixar de fazer efeito sobre um microrganismo que antes era susceptível).

Na área farmacêutica a ação antimicrobiana é de grande interesse por vários motivos. Destacam-se as numerosas doenças causadas por bactérias e a resistência que as mesmas adquirem frente à fármacos empregadas rotineiramente e de forma errônea, além do fato de 30% dos pacientes internados em hospitais necessitarem de medicamentos com ação antimicrobiana (CELLOTO et al., 2003; FRANÇA, 2006).

A terapia para infecções bacterianas e fúngicas, particularmente em paciente imunocomprometidos, representa um desafio para pesquisadores e profissionais da área médica. Os fármacos disponíveis estão diminuindo a eficácia frente a resistência que os microrganismos adquirem diante do uso não racional e pouco seguro dos fármacos ou devido a toxicidade que provocam. Estudos que contribuam na obtenção de fármacos oriundos de produtos naturais, seguros, estáveis, padronizados e eficientes poderão servir como modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas apropriadas para a produção de antimicrobianos efetivos e mais específicos contra bactérias, fungos, helmintos, protozoários, vírus, ou ainda como antitumorais. Esta especificidade também contribui para que se reduzam efeitos colaterais e indesejáveis ao hospedeiro, fato este, que muitas vezes limita a terapia medicamentosa instituída aos pacientes (MIGLIATO, 2006).

Segundo Sardi (2004), existem três classes gerais de mecanismos, que constituem alvos potenciais na terapêutica medicamentosa:

A) Reação de Classe I

Nesta classe há a utilização da glicose e outras fontes de carbono para produção de compostos carbonados simples. As reações que visam inibir a obtenção de energia a partir da glicose não são promissoras, visto que, tanto as bactérias, quanto as células humanas utilizam, para esta finalidade, a via de Embden-Meyerhof e o ciclo do ácido cítrico, até por que, mesmo

bloqueando a via da glicose as bactérias poderiam utilizar como alternativa outros compostos a exemplo dos aminoácidos e lactato.

B) Reação de Classe II

A energia e os compostos sintetizados na Classe I são utilizados na produção de pequenas moléculas, tais como os aminoácidos e nucleotídeos. Nesta reação são apresentados melhores alvos para a atuação das drogas, visto que algumas delas envolvidas ocorrem nas células parasitárias, mas não em células humanas, devido a evolução das espécies, como a produção de alguns aminoácidos pelas bactérias.

C) Reação de Classe III

Constituem alvos particularmente apropriados de toxicidade seletiva, por que cada célula deve produzir suas próprias macromoléculas, que simplesmente não podem ser obtidos do meio ambiente, havendo diferença clara entre as células dos mamíferos e as células parasitas. Os sítios alvos dos agentes antimicrobianos desta Classe são: Síntese de peptidoglicano (penicilinas, cefalosporinas e carbapenens); Síntese de proteínas (aminoglicosídeos, tetraciclina e o clorafenicol); Síntese de ácido nucléico (rifampicina e quinolonas).

A seleção perfeita dos agentes antimicrobianos para a terapia das doenças infecciosas é um procedimento complexo que exige julgamento clínico e conhecimento detalhado dos fatores farmacológicos e microbiológicos. Infelizmente, a decisão de usar antibióticos, é freqüentemente tomada de forma despreocupada, sem levar em conta o potencial do microrganismo infectante ou o aspecto farmacológico da substância (ANDRADE, 2008).

A diminuição na produção de novos antibacterianos, e o aumento de cepas multiresistentes tornaram-se, uma ameaça à saúde pública (CATÃO et al., 2005). A eficácia de muitos fármacos pode ser perdida, e o principal motivo é a resistência bacteriana, que pode ser transmitida de geração para geração (BLACK, 2002). Esta resistência tem se tornado uma ameaça aos tratamentos das doenças infecciosas, onde já foram encontrados casos de patógenos resistentes a quase todos os antibacterianos existentes no mercado, aumentando com isso a taxa de mortalidade e os custos dos serviços de saúde (PACKER, LUZ, 2007).

O crescente aumento de cepas com variáveis níveis de resistência aos antimicrobianos tem sido objeto de preocupação. Algumas pesquisas têm sido realizadas com a intenção de caracterizar a resistência e estabelecer fatores de risco para que isso ocorra. Este fenômeno é complexo e tem múltiplas causas, algumas já esclarecidas, outras ainda a esclarecer. Entre

estes fenômenos, que estão definitivamente vinculados ao crescimento da resistência está o uso abusivo de fármacos antimicrobianos (PACKER, LUZ, 2007).

Outros fatores que corroboram para este aumento incluem as características próprias dos microrganismos, a pressão seletiva pelo uso abusivo dos antibacterianos e o aumento da transmissão de patógenos multiresistentes pelas mudanças sociais e tecnológicas (RIOS, RECIO, 2005).

Atualmente quatro processos contribuem para o acúmulo da resistência: primeiro, espécies com resistência intrínseca são favorecidas; segundo, mutantes resistentes de linhagens previamente sensíveis são selecionados; terceiro, genes de resistência transferíveis disseminam entre os isolados bacterianos, carregados por plasmídios, transposons e integrons; e, por último, algumas linhagens resistentes propagam-se de modo epidêmico entre pacientes, hospitais e países. A importância relativa destes processos varia com o patógeno e com o local (RIOS, RECIO, 2005).

Nos ambientes hospitalares, o fenômeno da resistência bacteriana é bem conhecido; entretanto, os microrganismos responsáveis por infecções na comunidade, começaram a mostrar níveis crescentes de resistência: gonococos resistentes à ampicilina e *Shigella sp.* e *Salmonella*, também resistentes a ampicilina e cloranfenicol (PACKER, LUZ, 2007).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1983 mostrou preocupação com o tema, em relatório do grupo de trabalho sobre a resistência antimicrobiana. Desde então, várias iniciativas têm surgido com o intuito de avaliar e controlar o crescimento de cepas com resistência antimicrobiana em todo o mundo (SARTORATTO et al., 2004; CABRAL, 2008).

Entre as estratégias utilizadas para o manejo desse grave problema de saúde pública, três formas de atuação têm sido propostas: a caracterização das práticas atuais, através de estudos junto aos prestadores de cuidados, em relação aos seus hábitos de prescrição; a criação de guias e protocolos para o uso racional dos antimicrobianos; e, finalmente no desenvolvimento de materiais e estratégias educacionais (para médicos e usuários), visando alterar hábitos e comportamentos (LOGUERCIO et al., 2005).

Segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* 2005, os testes de sensibilidade a antimicrobianos são 22, indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso que exija uma terapia antimicrobiana quando for impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação. Estes testes são indicados quando se acredita que o microrganismo causador pertença a uma espécie capaz de produzir resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados.

2.4. Ação Antioxidante

As plantas medicinais também tem sido largamente estudadas como antioxidantes, sendo consideradas de grande relevância devido ao seu potencial como agentes profiláticos e terapêuticos em várias doenças. A descoberta do papel dos radicais livres no câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas e envelhecimento, têm levado à extensivas pesquisas sobre novos agentes antioxidantes (ROSSATO et al., 2009).

O radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) é a espécie mais reativa encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares provenientes das espécies redox-ativas, causando quebras na estrutura do DNA, lipoperoxidação de membranas e também, oxidação protéica (ANDREO, JORGE, 2006).

Antioxidantes são compostos que podem auxiliar na manutenção do equilíbrio redox, funcionando como bloqueadores dos processos de óxido-redução desencadeados por espécies reativas de oxigênio (EROs) em excesso (DUH, TU, YEN, 1999). As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, sendo capazes de provocar danos oxidativos nessas estruturas (HUANG, PRIOR, 2005).

Ainda segundo Ribeiro e Bernado-Gil (2001), os sistemas de defesa antioxidante dos organismos vivos podem ser divididos em quatro subclasses :

a) Defesas antioxidantes primárias de natureza enzimática e não enzimática, que estão diretamente relacionadas às espécies reativas de oxigênio. Como exemplo cita-se a atividade das enzimas catalase (ação sobre H_2O_2), e superóxido dismutase-SOD, (ação sobre $\text{O}_2^{\cdot-}$), além das vitaminas E (alfa-tocoferol, com ação sobre radicais peroxil) e C (ácido ascórbico, com ação sobre ozônio e hidroxil).

b) Defesas auxiliares que dão suporte ao funcionamento das defesas antioxidantes primárias, por exemplo, reciclando ou sintetizando substratos de enzimas antioxidantes.

c) Proteínas complexantes de metais (ferritina e transferrina) ou compostos de baixa massa molar que previnem ou minimizam a participação de metais na geração de radicais, devido a sua ação quelante (Desferoxamina – DFO);

d) Sistemas de reparo enzimático capazes de reconstituir biomoléculas degradadas, especialmente DNA oxidado (endonucleases e DNA glicosilases).

Contudo, quando há uma produção excessiva de EROs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes capaz de comprometer o balanço redox, o organismo pode estar submetido a um processo denominado de estresse oxidativo. Atualmente, aceita-se que em muitas situações patológicas um estresse oxidativo pode ser instalado nos organismos aeróbicos, sendo que as EROs podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do dano tecidual (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2009). As EROs estão relacionadas a várias doenças, como artrite, câncer, doenças do coração e do pulmão, esclerose múltipla entre outras (BARBOSA, 2008).

Dessa forma, a existência de substâncias capazes de minimizar os efeitos oxidantes sobre os componentes celulares é portanto de crucial importância para a manutenção da vida aeróbica na terra. Por outro lado, há autores que mencionam que uma proteção demasiada por parte destes antioxidantes pode ser conflituosa do ponto de vista evolutivo, já que esta defesa excessiva poderia prevenir alterações oxidativas do DNA as quais poderiam levar a mutações gênicas e eventualmente à outras estruturas celulares (BARBOSA, 2008).

É importante ressaltar que a maioria das defesas antioxidantes não enzimáticas não são sintetizadas endogenamente por animais, devendo ser obtidas a partir da dieta. Portanto, verifica-se a existência de uma relação íntima entre nutrição e defesa antioxidante. O reino vegetal dispõe de uma gama de compostos com potencial atividade antioxidante *in vivo* (RIBEIRO, BERNADO-GIL, 2001). Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia que seria prejudicial à célula; eles são neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outros antioxidantes (SOUZA et al., 2004).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido especial atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase (SOUZA et al., 2007). As propriedades antioxidantes dos flavonóides também tem atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois eles protegem os constituintes alimentares contra o dano oxidativo, podendo contribuir na prevenção de doenças, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres e outras (SANCHES, 2004; SANNOMIYA et al., 2004).

A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório. Uma característica-chave das doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide, é o aumento da expressão de certos genes que codificam proteínas (como as citocinas) e proteinases envolvidas na destruição

celular. Uma importante característica da expressão gênica é o controle da transcrição por proteínas específicas, os fatores de transcrição (ANDREO, JORGE, 2006).

Nas doenças inflamatórias, a homeostase entre a produção de antioxidantes e pró-oxidantes pode ser afetada, acarretando um aumento na produção de EROs, que por sua vez, destroem o antígeno responsável pelo processo inflamatório. Tal produção excessiva leva à injúria tecidual pelo dano causado às macromoléculas e lipoperoxidação de membranas. Ademais, as EROs podem atuar como mensageiras secundárias, ativando a produção de outros mediadores envolvidos no processo inflamatório (KVIECINSKI, 2008; ANETA, JAN, RENATA, 2007).

Apesar da ação deste sistema ainda não estar completamente elucidada, ela se mostra como um campo de alto interesse, principalmente na prevenção das doenças que podem ser causadas pelo estresse oxidativo (SALVEMINI, DOYLE, CUZZOCREA, 2006).

2.5 Nocicepção e Inflamação

O uso de plantas com propriedades terapêuticas é uma prática milenar sendo uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos (SANNOMIYA et al., 2005). A busca por alívio e cura da dor pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JR et al., 2006). Neste sentido, um interesse particular tem sido dado às plantas, uma vez que existem várias evidências de que um grande número de plantas medicinais contém compostos químicos que exibem atividade antiinflamatória (SOUZA et al., 2003).

A dor é uma percepção que tem o papel de ajudar a proteger o organismo (LE BARS, 2001). É claramente distinta da nocicepção. O termo “dor” refere-se a experiência desagradável associada com a lesão tecidual real ou potencial causada por um estímulo nocivo (MENDES, 2004). Como uma experiência, a dor inclui não somente a percepção sensorial de um estímulo nervoso, mas também dimensões cognitivas, emocionais, sociais, culturais e ambientais a ela associada (PEREIRA, 2006).

Entretanto, a nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte informação sobre lesões teciduais. É uma percepção sensorial no sistema nervoso

central (SNC) evocado pela ativação de neurônios sensoriais primários (nociceptores). Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nervoso (ALMEIDA et al., 2004; PEREIRA et al., 2006).

Há muito existe a preocupação em compreender o fenômeno da dor e, conseqüentemente, conceituá-lo. De acordo com a duração da lesão tecidual pode-se classificar a dor em aguda ou de curta duração, que persiste apenas enquanto durar o dano representando uma reação fisiológica normal; e a dor crônica ou lenta, associada às lesões mais profundas, evidenciando-se quando cessa a função dos mecanismos normais de cicatrização e estados patológicos que podem persistir por um longo período, como câncer, artrite reumatóide e pinçamentos nervosos (PEREIRA et al., 2006). Logo, a dor age de duas formas: uma é a resposta de aviso que promove a sobrevivência no ambiente hostil e perigoso, enquanto a outra é a expressão de mudanças no sistema nervoso, que pode ser patológica. A primeira é benéfica e a segunda não, sendo responsável por sofrimento persistente de milhões de pacientes (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006). Isto é corroborado por Julius e Basbaum (2001), pois a dor persistente perde sua utilidade como sistema de aviso e se torna crônica e debilitante. Esta segunda forma de dor adaptativa se manifesta uma vez que a lesão tecidual ocorreu, onde o intuito é tentar auxiliar a reparação. A dor contribui estabelecendo um estado de hipersensibilidade localizada dentro e ao redor da região lesada. Um estímulo que normalmente acarretaria apenas uma sensação inócua torna-se desconfortável (WOOLF, 2000).

No que tange o tratamento, a dor aguda raramente precisa de atenção médica; e, quando isso acontece, drogas antiinflamatórias não esteroidais, analgésicos (opióides) ou anestésicos locais, podem controlá-la. Quase todos os analgésicos usados atualmente foram inicialmente desenvolvidos para tratar a dor aguda. Entretanto, a dor crônica difere da aguda não apenas na instalação e duração, mas também nos mecanismos envolvidos. A dor crônica pode não ter lesão ou inflamação identificável e responde pobremente a antiinflamatórios não esteroidais ou opióides (JURGENSEN, 2007).

Assim, a dor torna-se crônica quando o controle da patologia não é satisfatória, persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (KVIECINSKI, 2008). Esse tipo de dor é resultante de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do SNC, ou do sistema nervoso periférico (SNP). Contudo, a dor crônica gera

estresse, reduz a imunidade, diminui a produção de endorfinas, causa alterações do sono e pode levar a depressão (JURGENSEN, 2007). As dores crônicas mais comuns incluem a neuralgia do trigêmeo, fibromialgia, as síndromes dolorosas complexas regionais, a dor associada com artrite, dor do membro fantasma e as síndromes dolorosas centrais (KVIECINSKI, 2008).

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (PEREIRA, 2006). Normalmente a sensação dolorosa é iniciada com a detecção de um estímulo nocivo, ou potencialmente nocivo, de natureza mecânica, térmica ou química por sensores periféricos chamados nociceptores. Apesar do termo sugerir uma estrutura especializada, os nociceptores são terminações nervosas livres associadas a fibras aferentes primárias finas não mielinizadas, denominadas fibras C, com baixa capacidade de condução (0,5-2 m/s) ou mielinizadas, as fibras A δ e conduzem o impulso nervoso com maior facilidade (10-30 m/s), havendo ainda as fibras (A β) que também são mielinizadas e de grande diâmetro sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso (MAI, 2007).

Estas fibras são formadas por neurônios cujos corpos celulares encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e trigeminal, e são responsáveis pela condução das informações nociceptivas até o corno dorsal da medula espinhal e o núcleo trigeminal *pars caudalis* na ponte, respectivamente. Imediatamente, um reflexo de retirada mediado pela medula espinhal é desencadeado no intuito de remover a região do corpo ameaçada (OLIVEIRA et al., 2005).

No entanto, quando há lesão tecidual inicia-se a síntese e liberação de substâncias que induzem à inflamação, a formação de edema, a vasodilatação e a migração de células como parte da resposta inflamatória e do processo de recuperação. Entretanto, estes mediadores também ativam e/ou sensibilizam os nociceptores e recrutam outros para exacerbar o sinal da dor. Tais mediadores químicos incluem aminoácidos excitatórios, NO, bradicinina, prostaglandinas, histamina, substância P e fator de crescimento neural (NGF) (NATH, 2006). Os mediadores inflamatórios, atuando de forma altamente orquestrada, contribuem para mudanças na permeabilidade vascular, resultando em edema e eritema (rubor). Também ocorre sensibilização dos nociceptores periféricos por início de uma cascata de eventos que muda as condutâncias iônicas da terminação das fibras sensoriais periféricas (OLIVEIRA et al., 2005; KVIECINSKI, 2008). A sensibilização dos nociceptores diminui o limiar de ativação e aumenta a probabilidade de que estes disparem com estímulos de menor intensidade (JURGENSEN, 2007).

Diversos são os neuromediadores inflamatórios que, quando liberados de macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, ativam os nociceptores (fibras nervosas tipos A, δ e C), facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia. Dentre esses, destacam-se a acetilcolina, a bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o fator de ativação plaquetário, os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, as tromboxanas, as interleucinas e fator de crescimento nervoso (NGF). A bradicinina, a prostaglandina E_2 , o NGF e as interleucinas pró-inflamatórias, contudo, parecem exercer papel fundamental na nocicepção periférica (KRAYCHETE, CALASANS, 2006).

Para o alívio da dor, inflamação, febre, assim como para proteção cardiovascular, são prescritos mundialmente os AINEs. Embora os AINEs sejam altamente eficazes, a ocorrência do seu uso pode ser associada a uma taxa elevada de efeitos colaterais, entre eles, erosões da mucosa que podem evoluir para úlceras, risco de complicações como a perfuração intestinal, hemorragia, dano renal, aumento da pressão arterial e a presença de alguns problemas cardiovasculares (BURKE, SMYTH, FITZGERALD, 2006). Dessa forma, durante as últimas décadas, muitos pesquisadores se concentraram em estudo envolvendo medicamentos obtidos a partir de plantas com efeitos anti-inflamatório e analgésico (HAJHASHEMI, SAJJADI, HESHMATI, 2009).

Entre os fármacos usados para o alívio da dor, mas que não são usados como antipiréticos ou para redução do edema inflamatório, os analgésicos opióides são os mais conhecidos. Apesar do uso amplo dos AINEs e analgésicos opióides, a sua eficácia analgésica é reduzida em muitas condições dolorosas. Assim, alguns fármacos originalmente aprovados para o tratamento de outras doenças têm sido usados para o alívio da dor associada ou não a processos inflamatórios. A base racional para o uso desses fármacos está no conhecimento dos seus alvos moleculares e das estruturas e sistemas envolvidos na transmissão e processamento da informação nociceptiva (BERTOLLO, 2006).

Os opióides foram e ainda estão sendo usados para o tratamento de vários tipos de dor em seres humanos e animais. Os efeitos dos opióides são mediados através de receptores específicos, que são amplamente distribuídos no SNC. O papel dos receptores opióides na modulação da dor tem sido investigado em uma grande variedade de espécies animais e parece que os seus mecanismos de ação são diversos em diferentes tipos de dor e também em diferentes espécies animais (TOWETT, KANUI, JUMA, 2006). Conforme se pode constatar nos registros mais antigos que se tem conhecimento, a exemplo da salicilina, que por algum

tempo foi usada para combater a dor e mais tarde serviu como base para a síntese do ácido acetilsalicílico em 1899. Também, pode-se citar o ópio (que em grego quer dizer suco) originário da *Papaver somniferum* ou “papoula” do qual é obtida a morfina, substância com potente atividade analgésica (TOWETT, KANUI, JUMA, 2006).

No Brasil, o número de estudos farmacológicos com plantas buscando atividade antinociceptiva é vasta. Pode-se destacar as plantas: *Petiveria alliaceae*, *Pterodon polygalaeflorus*, *Croton cajucara*, *Sebastiania schottiana*, *Tabebuia avellanedae*, *Croton zehntneri*, *Croton polyanthemum*, e *Copaifera reticulata* (FISCHER, 2007).

Estudo realizado por Freitas (2009) indicou que o extrato da planta *Baccharis illinita* DC (Asteraceae) conhecida como “chá-ventura” ou “erva-milagrosa” possui uma significativa atividade antinociceptiva. O chá da planta é utilizada na medicina popular como antiinflamatório, cicatrizante de pele e mucosas, antiinfecioso e protetor gástrico. Outro estudo realizado por Jurgensen (2007) mostrou o efeito antinociceptivo de uma fração de alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* conhecida como “unha-de-gato”.

Plantas medicinais também vêm sendo estudadas para elucidação de seus mecanismos antiinflamatórios, já que além da dor derivada de processos neurogênicos, neuropáticos e nociceptivos, pode-se citar outro tipo de dor, a inflamatória (GEREMIAS, 2004). A reação inflamatória é caracterizada por vermelhidão, calor, dor e função perdida (BATISTA et al., 2005; DIAS et al., 2007).

Todo elemento que possa estimular o organismo pode ser considerado como eventual agente etiológico da inflamação, dentre eles destacam-se os agentes químicos (cáusticos, metais pesados, ácidos, álcalis fortes, micotoxinas, venenos vegetais e animais); agentes físicos (calor e frio, eletricidade, radiações, sons e ultra-sons, traumas mecânicos e atritos); biológicos (vírus, exo e endotoxinas bacterianas, fungos, protozoários, helmintos, artrópodes, entre outros). As degenerações ou necroses tissulares e os derivados de alterações na resposta imunológica (por imunocomplexo ou autoimunidade), são outros agentes que podem ser mencionados (GEREMIAS, 2004; OJEWOLE, 2005).

Dentro desse contexto, a inflamação é uma resposta fisiológica do organismo a estímulos, incluindo infecções e lesões dos tecidos que protege o corpo a partir de estímulos inflamatórios. No entanto, a inflamação excessiva ou persistente causa uma variedade de condições patológicas, tais como sepse bacteriana, artrite reumatóide e inflamação da pele (KANG et al., 2009). Em resposta a uma lesão tecidual, o organismo humano monta uma rede de sinais químicos que estimula a resolução do dano. Estes sinais dão início a ativação e

quimiotaxia de leucócitos da circulação geral para os locais da inflamação (JABBOUR et al., 2009).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais clássicos da inflamação. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório (RESENDE et al., 2006; RANG, DALE, RITTER, 2007).

Os leucócitos circulantes aproximam-se da parede vascular estimulados por mediadores da inflamação liberados na área da lesão, tornando-se transitoriamente aderidos ao endotélio e atravessando dessa maneira a parede do vaso. Após diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia, com o objetivo maior de eliminar o agente causal e restabelecer o tecido lesado (WEFFORT-SANTOS, PRESIBELLA, SANTOS, 2003). Sinais inflamatórios ativam as células-tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea a produzir monócitos. Monócitos dão origem aos macrófagos ou células dendríticas e são recrutados por quimiotaxia para os tecidos danificados por extravasamento (ZIEGLER-HEITBROCK, 2007).

Uma vez ativados, monócitos/macrófagos produzem várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, incluindo IL-1, IL-6, TNF α e proteínas inflamatórias. Sob certos estímulos, os monócitos circulantes diferenciam-se em macrófagos. Os macrófagos são células fagocíticas especializadas na remoção por endocitose de várias formas celulares indesejadas, detritos extracelulares e microorganismos invasores (APOSTOLAKIS, YHLIP, SHANTSILA, 2009).

A ativação dos macrófagos leva a expressão de uma série de genes envolvidos na defesa do organismo, onde a expressão desses genes resulta na liberação de mediadores pró-inflamatórios, como lipídios bioativos (prostanóides, ácido araquidônicos e outros derivados metabólitos), espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio e metaloproteínases necessárias para a remodelação tecidual. Elevada expressão da síntese de óxido nítrico após a expressão induzida de macrófagos ativados é um dos principais mecanismos citostático, citotóxico e pró-apoptóticos que participam na resposta inata e em muitos processos inflamatórios (BOSCÁ et al., 2005; MOMIN, WOOD, 2008).

Os maiores produtores de EROs no tecido inflamatório são os leucócitos sanguíneos, os quais tornam-se ativados e aderem-se à superfície das células endoteliais. Existem outras células inflamatórias como linfócitos e macrófagos que também possuem NADPH oxidase na

membrana. A cascata do ácido araquidônico que gera prostaglandinas e leucotrienos, também gera EROs no processo de síntese de eicosanóides (FREITAS, 2009; DENG, LUYENDYK, GANEY, 2009).

Também já foi relatado que a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), dois mediadores importantes no processo inflamatório, são capazes de induzir a produção de EROs. A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório (FREITAS, 2009).

Existem muitas causas para a inflamação, sendo os mecanismos comuns a todas, onde o agente inflamatório age na membrana celular induzindo a ativação da fosfolipase A2 e consequentemente, liberando o ácido araquidônico e os mediadores inflamatórios, como citocinas, histamina, serotonina, leucotrienos e prostaglandinas que aumentam a permeabilidade vascular e a migração leucocitária a agir sobre o local do tecido inflamado. Qualquer interrupção dessa sequência de eventos resulta na redução da liberação dos mediadores levando a microcirculação a voltar ao estado hemodinâmico normal. Embora, exista um mecanismo de defesa, os complexos eventos e mediadores envolvidos na reação inflamatória podem induzir, manter ou agravar muitas doenças (DASSOLER et al., 2004).

Em condições normais, a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluidos vindos do sangue, causando edema tecidual (SHIRKE, JAGTAP, PHADKE, 2004; KVIECINSKI, 2007).

Quando exacerbada, a reação inflamatória pode ser potencialmente prejudicial. Nessa situação, é necessário o uso de fármacos com atividade antiinflamatória, os quais irão interferir em uma ou mais etapas da cascata de eventos, que caracterizam a resposta inflamatória, particularmente, aquelas que se relacionam com os mecanismos de adesão e migração dos leucócitos (WEFFORT-SANTOS, PRESIBELLA, SANTOS, 2003).

Portanto, o processo inflamatório tem a finalidade de dominar, minimizar, neutralizar, destruir, eliminar o agente agressor, assim como induzir a reparação de células do epitélio (reepitelização), do parênquima (regeneração), do estroma (cicatrização) (CONE, 2001). Por isso, nos últimos anos, muitas espécies vegetais com propriedade antiinflamatória tem sido estudada: *Lychnophora ericoides*, *Torresea cearensis*, *Justicia pectoralis*, *Eclepta alba*,

Pteridin plygaliflorus e *Hybanthus ipecacuanha*, *Polygonum punctatum*, *Tabebuia avallanadae*; *Vernonia condensata*, *Cupania vernalis*, *Austroplenckia populnea* (FISCHER, 2007). Assim, conhecer e compreender os fatores envolvidos na gênese e transmissão da dor é fundamental ao estudo do mecanismo de ação de novas substâncias (RESENDE et al, 2006).

3. OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a atividade biológica do extrato seco liofilizado da *Remiria maritima* Aubl. utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Específicos:

- Realizar triagem fitoquímica do extrato seco liofilizado da *R. maritima*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana por difusão em poços, determinar a concentração inibitória e microbicida mínima do extrato seco liofilizado da *R. maritima*.
- Avaliar a atividade antioxidante utilizando modelo “*in vitro*” do extrato seco liofilizado da *R. maritima*.
- Estudar os efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios do extrato seco liofilizado da *R. maritima*. utilizando animais de experimentação.
- Trazer de forma inédita na literatura estudos fitoquímicos e farmacológicos da *R. maritima*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Material Vegetal: coleta e identificação

A matéria-prima vegetal foi constituída da planta inteira de *Remirea maritima* Aubl., coletada na região de praia do município de Pirambu - Sergipe (10°55'S, 35°6'W) nos meses de Janeiro, fevereiro e março de 2009. Após a coleta, parte do material foi enviado para identificação e depósito no herbário ASE 15137 do Departamento de Biologia da UFS, tendo Professora Doutora Ana Paula Prata como Botânica responsável a identificação botânica (ANEXO 1).

4.2 Métodos

4.2.1. Tratamento do material vegetal

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, até estabilização da umidade residual. Após secagem, o material vegetal foi selecionado manualmente e pesado. Uma vez procedida a secagem, todo o material foi submetido à moagem, em moinho de facas, constituindo, assim, a droga vegetal.

4.2.2. Preparo da solução extrativa e do extrato seco liofilizado

A solução extrativa foi obtida por método de extração decocção da matéria-prima vegetal seca e moída em água fervente durante 30 minutos, em uma relação planta solvente de 5% (m/v). Foram utilizados cerca de 10 g de matéria-prima vegetal. Após a extração, um volume de 100 mL do extrato foi transferido para um frasco de liofilização, congelado e liofilizado nas seguintes condições: Temperatura ($- 50^{\circ}\text{C}$) , pressão de 150 micrometros de mercúrio no tempo de 72 horas em um aparelho de marca Terroni LS 3000. O extrato seco final foi de 1,94 gramas.

4.3. Triagem fitoquímica

O extrato liofilizado foi submetido à prospecção fitoquímica, seguindo-se a descrição de Radi e Terrones (2000). Esta metodologia teve como objetivo detectar a ocorrência das diversas classes dos constituintes químicos presentes no extrato liofilizado da *R. maritima* Aubl.

4.3.1 Teste para fenóis e taninos

Para determinação de fenóis e taninos foi adicionado ao ERMA três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 1mol.L^{-1} , reconstituído em meio etanólico. Em seguida, o tubo foi submetido à agitação e observado quanto à variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado a um teste em branco, usando-se água e FeCl_3 . Neste caso, a coloração variando entre azul e vermelho foi indicativa de fenóis. A formação de um precipitado azul escuro ou verde indica a presença de taninos.

A solução de FeCl_3 1mol.L^{-1} foi preparada adicionando-se 9 g deste reagente em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de HCl 3 mols. L^{-1} . Em seguida completou-se o volume para 100 mL com etanol em um balão volumétrico.

4.3.2 Teste para flavonóides

Colocou-se em um tubo 2 mL da solução metanólica, de alguns fragmentos de Mg^{++} e agregou-se, as mesmas nas paredes do tubo, algumas gotas de HCl diluído. A formação de coloração róseo-avermelhada, violeta ou laranja foi indicativo, da presença de flavonóides.

4.3.3 Teste para esteróides e triterpenóides Liebermann-Buchard

Adicionou-se 10 mL de uma solução metanólica do extrato em um béquer e deixado secar em banho-maria. Em seguida foi extraído o resíduo seco do becker três vezes com porções de 1-2 mL de CHCl_3 . Separou-se o extrato em tubos diferentes e colocou-se algumas gotas de CHCl_3 . Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com algodão, coberta com miligramas de Na_2SO_4 anidro, para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ e agitou-se suavemente. Adicionou-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 foi indicativo, da presença de esteróides. Coloração parda até vermelha indicou triterpenóides .

4.3.4 Teste para Saponinas

Os resíduos insolúveis em clorofórmio, foram separados no teste anterior e solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução clorofórmica para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por dois a três minutos e observou-se a formação da espuma. Uma espuma persistente e abundante indicou a presença de saponinas.

4.3.5 Teste para alcalóides

O ERMA foi separado em tubos diferentes, solubilizado com metanol e submetidos à cromatografia em camada delgada. Após eluição, o cromatograma foi revelado com reagente de Dragendorff. O surgimento de manchas de cor alaranjada indicou a presença de alcalóides.

4.3.6 Teste para cumarinas voláteis

Em um tubo de ensaio colocou-se 2 mL da solução metanólica, tampou-se com papel de filtro impregnado em solução 10% de NaOH e levou-se a banho maria a 100°C por alguns minutos. Removeu-se o papel de filtro e examinou-se sob luz ultravioleta. A fluorescência amarela indicou a presença de cumarinas.

4.3.7 Derivados antracênicos livres-quinonas

Colocou-se em um tubo de ensaio 2 mL da solução metanólica e adicionou-se 5 mL de clorofórmio e agitou-se. Deixou-se em repouso por 15 minutos. Recolheu-se a fase clorofórmica e dividiu-a em dois tubos de ensaio. No primeiro tubo, colocou-se 1,0 mL de solução aquosa de NaOH a 5%. A coloração roxa em fase aquosa indicou a presença de antraquinonas (Reação de Borntraeger). No segundo tubo, adicionou-se 2 mL de solução de acetato de magnésio a 5 % em metanol. A coloração roxa indicou a presença de antraquinonas livres.

4.4 Avaliação da atividade biológica

4.4.1. Atividade antimicrobiana

4.4.1.1. Perfil de sensibilidade

Os perfis de sensibilidade para verificar a atividade antimicrobiana do extrato seco da *Remirea maritima* Aubl.(ERMA) foram baseados nos protocolos elaborados e determinados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2005).

4.4.1.2 Ensaio com microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus coagulase negativo*) e Gram-negativas (*Proteus mirabilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter sp.*) adquiridas na *American Type Culture Collection* (ATCC).

4.4.1.3. Preparo das amostras

Antes da realização dos testes as amostras de bactérias foram cultivadas em Agar Mueller-Hinton, seguidas de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.

4.4.1.4. Preparo do meio de cultura

a) Preparou-se 500 ml de Agar Mueller Hinton desidratado (Difco, Michigan,USA) na proporção 19 g do Agar em 500 mL de água destilada, conforme especificação do fabricante, e deixado em repouso na temperatura ambiente para hidratar.

b) Submeteu-se à esterilização por calor úmido, em autoclave à 121°C por 15 min.

c) Deixou-se resfriar após a autoclavação, até a temperatura de $45-50^\circ\text{C}$.

d) Dispensou-se em placas de petri de 150 x 10 mm, 25 mL do Agar Mueller-Hinton, com uma pipeta de vidro graduada esterilizada, em capela de fluxo Laminar (Quimis, Q216F2, Diadema).

e) Preparou-se 48 tubos de ensaio (20 x 200 mm) com tampa rosqueada, contendo 12,5 mL de Agar Mueller Hinton, deixado resfriar até a temperatura de 50°C. Em seguida foram acondicionados em Banho Maria na temperatura de 50°C (FANEM, 102) para manter-se líquido até a hora do procedimento.

f) Foram preparados 36 tubos de ensaio medindo 10 x 100 mm contendo 2,5 mL de Caldo Mueller Hinton (DIFCO, Michigan, USA), na proporção de 21 g do Agar desidratado em 1000 mL de água destilada conforme especificação do fabricante, sendo esterilizado em autoclave a 121°C, durante 15 min.

4.4.1.5. Preparo do inóculo

Foi preparada uma suspensão de células bacterianas seguida de ajustamento para a escala padrão 0,5 de Mac farland, com salina estéril, com aproximadamente 1×10^8 UFC para bactéria. As suspensões foram ajustadas para uma concentração final de 5×10^4 UFC para bactérias, conforme descrito no guia (CLSI, 2005) (Figura 2).



Figura 2. Comparação do inóculo com a escala de Mac Farland.

4.4.1.6. Preparo das concentrações do extrato

O extrato utilizado foi diluído em caldo Mueller-Hinton e as concentrações para os testes variaram entre 50 mg/mL e 0,09 mg/mL.

4.4.1.7. Método da difusão em Agar-Técnica do poço

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão utilizando a técnicas do poço (GROOVE, RANDALL, 1955; BAUER et al., 1966; NCCLS, 2003) (Figura 3).



Figura 3. Método da difusão em Agar – técnica do poço.

4.4.1.8. Procedimentos

Misturou-se o inóculo no tubo de ensaio medindo 20 x 200 mm, contendo 12,5 mL de Agar, imediatamente após a mistura, foi vertido sobre a placa de Petri já com a camada de Agar base, deixado em temperatura ambiente para solidificar. Fez-se poços com um canudo de plástico de 6 mm, descartável e estéril (biobrás). Dispensou-se em cada poço devidamente identificado, 10,0 μ L do controle positivo e negativo, assim como de cada concentração do extrato, utilizando-se uma pipeta automática. Colocou-se papel de filtro entre a placa de Petri e a tampa, para evitar a formação de água na tampa e como consequência no meio de cultura. Permaneceu em temperatura ambiente durante 2 horas para a solução ser difundida pelo Agar, antes do crescimento microbiano como preconizado pelo CLSI (2005). Em seguida, o material foi incubado em estufa a 35°C por 24 horas. Mediu-se em milímetros o halo de inibição do crescimento, utilizando régua milimetrada (Figura 4).

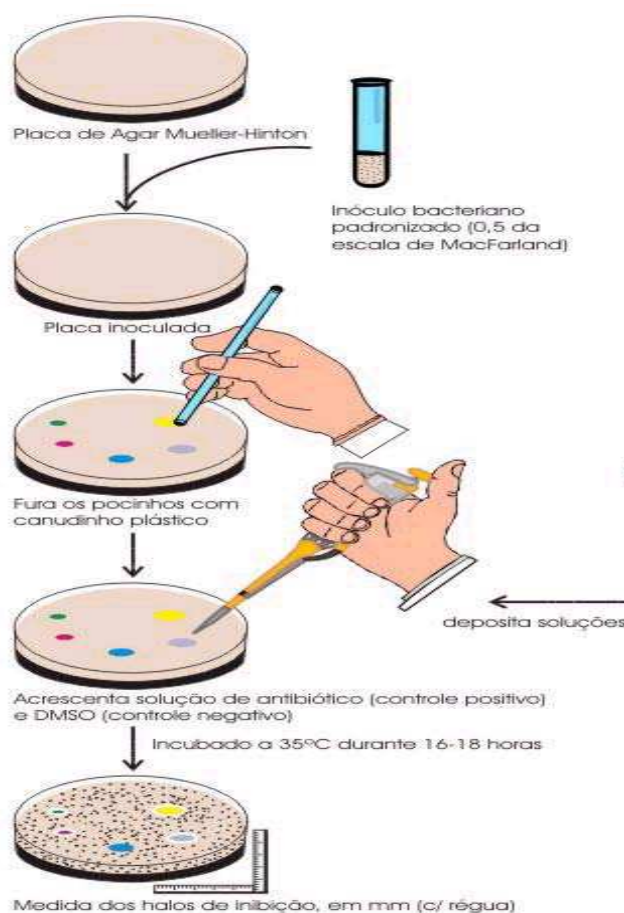


Figura 4. Fluxograma do método de avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em Agar - técnica do poço.

Fonte: REIS, 2006

4.4.1.9. Teste da microdiluição

Os experimentos foram realizados em duplicata nas placas de microtitulação de 12 x oito poços de fundo chato (Figura 5). Em cada poço, inoculou-se 10 μ L da suspensão, 90 μ L de caldo Mueller-Hinton e 100 μ L da concentração do extrato. Para padronizar a concentração inibitória mínima (CIM), realizou-se controles positivos.

- suspensão celular acrescido de meios caldo Mueller-Hinton sem o fármaco padrão;
- Extrato puro adicionado ao meios de cultura.

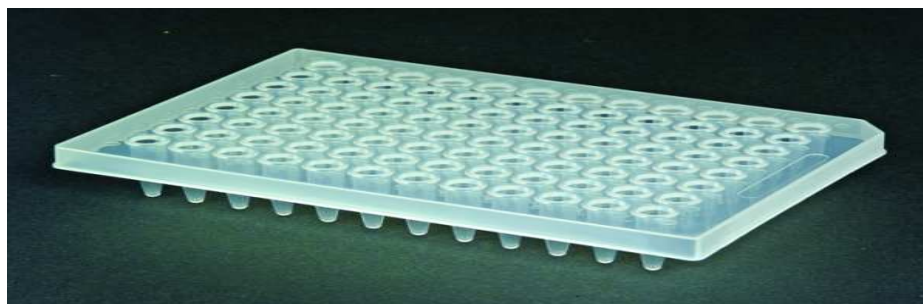


Figura 5. Placa de Microtitulação para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

4.4.1.10 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Após a inoculação, as placas de microtitulação permaneceram incubadas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ seguida de leitura em 24, 48 e 72 horas. O ponto final da concentração inibitória mínima foi determinado nas leituras de 24, 48 e 72 horas.

A CIM foi definida como a menor concentração, em que comparando com o controle positivo, ou seja, onde há apenas o meio de cultura com o inóculo, não possa ser atribuído crescimento microbiano.

4.4.1.11 Determinação da concentração microbicide mínima (CMM)

Nos poços onde não ocorreu crescimento microbiano visível foram retirados 100 μL do conteúdo e semeados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrosado ou Ágar Mueller-Hinton e em seguida foram espalhadas com alças de Drigalsky. Incubou-se as placas a temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}$ e as leituras da concentração microbicide mínima (CMM) foram realizadas após 24 a 72 horas de cultivo. Considerou-se a CMM a menor concentração na qual não se obteve crescimento nas placas.

4.4.2. Análise da atividade antioxidante

4.4.2.1 Medida da lipoperoxidação (TBARS) *in vitro*

A avaliação da peroxidação lipídica foi realizada em quadruplicata, pela detecção dos seus derivados lipoperóxidos, através de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), destacando-se o malondialdeído, produzindo uma base de Schiff de coloração rosácea (OHKAWA, OHISI, YAGI, 1979).

Em tubos Pirex com tampa de rosca foram adicionados 1000 µL de homogeneizado de gema de ovo 1% (v/v) em tampão fosfato (pH=7,4). A este meio foram adicionados 100 µL dos diferentes concentrações do ERMA (10 µg.mL⁻¹, 100 µg.mL⁻¹ e 1 mg.mL⁻¹).

Após a adição das amostras foram pipetados 100 µL de um sistema *in vitro* de produção de radicais 120 mM 2,2-azobis[2-metilpropionamidina] dihidroclreto (AAPH), em tampão ácido tio-barbitúrico (TBA, solução 0,67%). Ao final foi adicionado tampão TBA até volume de 1,2 mL. Esta mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Passado este período retirou-se 300 µL de cada tubo e transferiu-se para tubos tipo *eppendorf* 600 µL de ácido tri-cloroacético (TCA) 15% que foram adicionados aos tubos *eppendorfs* e centrifugados a 10000 rpm a 4°C., 500 µL do sobrenadante de cada *eppendorf* foram transferidos para tubos de reação e acrescidos de 500 µL de TBA 0,67% em água Milli-Q. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante 30 minutos a temperatura de 37°C. Após este período a absorvância foi medida a 532 nm. A equação abaixo mostra como foi calculada a porcentagem de inibição de peroxidação:

$$\text{Inibição da peroxidação lipídica (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{CONT}} - \text{Abs}_{\text{AMOS}}}{\text{Abs}_{\text{CONT}}} \times 100$$

Na qual Abs_{cont} é a absorvância do controle que não foi incubado com nenhum tratamento e Abs_{amos} a absorvância das amostras incubadas com diferentes concentrações dos tratamentos.

4.4.2.2. Atividade antioxidante frente ao óxido nítrico (NO)

A atividade *scavengers* frente ao radical NO foi realizada em quadruplicata conforme metodologia descrita por XU e colaboradores (2008). A atividade do ERMA como *scavengers* de radical NO foi medida em um sistema *in vitro* de produção de NO por nitroprussiato de sódio em tampão fosfato 20 mM (pH 7.4). A mistura de reação (1 mL) contendo 10 mM nitroprussiato de sódio (SNP) em tampão fosfato e ERMA em diferentes concentrações (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1 mg.mL^{-1}) foram incubados a 37°C por 1 h. Uma alíquota de 0,5 mL foi tomada e homogeneizado com 0,5 mL de reagente de Griess e incubado por mais 15 minutos. A absorvância do cromóforo foi medido em 540 nm. A percentagem de inibição do óxido nítrico gerado foi medido pela comparação dos valores de absorvância do controle negativo (apenas nitroprussiato de sódio 10 mM e veículo) e preparações para análise. Os resultados foram expressos como porcentagem por SNP.

4.4.2.3. Atividade *scavenger* de radicais hidroxil

Em tubos Pirex com tampa de rosca foram adicionados 100 μL de 2 deoxirribose (50 mM) em água Milli-Q (substrato), 100 μL de FeSO_4 (60 mM), 100 μL H_2O_2 (1 mM) em água Milli-Q (sistema gerador). A este meio foram adicionados 100 μL das diferentes concentrações do ERMA (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1 mg.mL^{-1}) e o padrão antioxidante, constituindo os diferentes grupos de tratamentos.

Após a adição das amostras foi adicionada solução tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,2) até volume de 900 μL . Ao final foi adicionado 100 μL de H_2O_2 (10 mM) em água Milli-Q. Esta mistura foi incubada a 27°C por 15 minutos. Passado este período a reação foi interrompida mediante a adição de 500 μL de ácido fosfórico 4 % (v/v). Após a incubação 500 μL de TBA (1,0 %) em NaOH 50 mM, foram adicionados. A mistura final foi aquecida em banho-maria durante quinze minutos. Após este período a absorvância foi medida a 532 nm.

O percentual de inibição de radicais hidroxila (atividade *scavenger* de radicais hidroxila) foi expresso pela equação (ROOME, et al., 2008).

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{CONT}} - \text{Abs}_{\text{AMOS}}}{\text{Abs}_{\text{CONT}}} \times 100$$

4.4.3. Avaliação Farmacológica

4.4.3.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com 2-3 meses, pesando em média 25-35 g, provenientes do Biotério da UFS. Todos os animais foram mantidos até o dia dos experimentos em gaiolas de polipropileno, a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e mantendo o ciclo claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso a alimentação do tipo "pellets" (Labina) e água, (disponível em frascos de vidro com bicos apropriados).

Todos os protocolos experimentais respeitaram os critérios éticos de experimentação animal preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL) e *Internacional Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Sergipe com protocolo (56/09) (ANEXO 2).

4.4.3.2. Atividade antinociceptiva e antiinflamatória

Foram utilizados modelos experimentais de nocicepção amplamente descritos na literatura (OLUGBENGA-MOREBISEA et al., 2001, SILVA et al., 2005). Em todos os testes os animais receberam as substâncias teste ou salina + tween 80 a 0,2% (grupo controle) sendo comparados entre si.

4.4.3.3. Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,9%

O método se baseia no fato que a administração, via intraperitoneal (i.p.) de uma solução de ácido acético a 0,9% em camundongos, provoca alterações no comportamento que se caracterizam por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores (KOSTER et al., 1959) (Figura 6).

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos ($n = 6$, por grupo). Todos os animais receberam administração via i.p. de ácido acético 0,9% (0,1 ml/10 g). Após 10 minutos da injeção do ácido, o número de contorções abdominais foi registrado durante o período de 15 minutos, para cada animal. Os animais foram pré-tratados com o ERMA (100,

200 e 400 mg/kg) e veículo (salina mais 2 gotas de tween), todos pela via i.p., meia hora antes da administração do agente álgico. O acetilsalicílico (200 mg/kg) foi administrado 30 minutos antes do agente nociceptivo, como substância padrão.



Figura 6- Alterações comportamentais caracterizadas por contorções abdominais seguidas de extensões dos membros posteriores.

4.4.3.4. Teste da formalina a 1%

O teste da formalina é considerado um modelo de dor aguda, produzida pela administração intraplantar de formalina a 1%, que causa a estimulação de nociceptores, podendo ser considerado um modelo bifásico de comportamentos indicativos de dor (dor neurogênica e dor inflamatória (HUNSKAAR, HOLE, 1987). A primeira fase (Fase 1) ocorre após cerca de 5 minutos da injeção e, provavelmente, é resultante da estimulação direta dos nociceptores; a inibição dessa fase é indicativa de fármacos analgésicos que atuam em nível central. Em seguida, há um período de latência (interfase) que dura aproximadamente 10 minutos e resulta de uma ativação de mecanismos inibitórios da dor. Na sequência, ocorre uma segunda fase (Fase 2) com duração de 15 minutos, gerada tanto pela estimulação dos nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios, encontrando a medula espinhal em um estado de hiperexcitabilidade, induzida na Fase 1. Além de outros fármacos que atuam em nível central, os anti-inflamatórios interferem nessa etapa (ALMEIDA et al., 1999).

Grupos de camundongos (n = 6, por grupo) receberam a administração de formalina 1% (20 µl/animal). Logo após a administração de formalina foi cronometrado o tempo (s) que os animais exibiam o comportamento de lambida da pata traseira esquerda durante a primeira fase (0-5 min) e a segunda fase (15-30 min) do teste. Os animais foram pré-tratados com o ERMA (100, 200 e 400 mg/Kg; i.p.), ácido acetilsalicílico (200 mg/kg; i.p.) e morfina (5 mg/kg; i.p.), 30 minutos antes da injeção de formalina (Figura 7).



Figura 7- Alterações comportamentais caracterizadas pelo tempo do número de lambidas de pata

4.4.3.5. Teste da placa quente

O método foi descrito inicialmente por Woolfe e MacDonald (1944), em que o tempo de reação do animal ao estímulo térmico é quantificado quando é exibido o comportamento de levantar (tentativa de pular) ou lambe uma das patas traseiras, o que é indicativo de nocicepção. Esses dois comportamentos são interpretados como respostas integradas no córtex cerebral, enquanto a agitação das patas posteriores (sapateado) é interpretada como sendo uma resposta apenas de integração medular. A latência de resposta é quantificada em um tempo máximo de 30 segundos, para que se evite lesão tecidual, e pode ser modificada por analgésicos de ação central, como os narcóticos (LE BARS et al, 2001)

Os animais ($n = 6$, por grupo) foram colocados em uma cuba de acrílico sobre uma placa quente de alumínio a $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$. O parâmetro de observação foi o número de lambidas das patas traseiras. Foi registrado o tempo de latência (s) dos camundongos, por um tempo máximo de 30 s, nos intervalos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os animais foram pré-tratados com o ERMA (100, 200 e 400 mg/Kg; i.p.), veículo ou morfina (5 mg/Kg; i.p.) 30 minutos antes de serem submetidos à placa quente.

4.4.3.6. Teste da Coordenação Motora

A avaliação da coordenação motora dos animais tratados com o ERMA foi realizada de acordo com protocolo proposto por Gonçalves e colaboradores (2008). Os camundongos foram pré-selecionados 24 horas antes do teste e submetidos ao teste de coordenação motora utilizando o aparelho Rota-rod (AVS[®], Brazil) (Figura 8). Foram considerados aptos aqueles animais que mantiveram-se sobre a barra giratória durante 180 segundos a 7 rpm em pelo

menos uma das três tentativas. Os animais foram divididos em cinco grupos (n=6, por grupo) e submetidos aos seguintes tratamentos: ERMA (100, 200 e 400 mg/kg; i.p.), diazepam 1,5 mg/kg (i.p.) e o veículo (solução salina e 2 gotas de tween 80 a 0,2%). Após 30, 60 e 120 minutos da administração registraram-se os resultados obtidos.



Figura 8. Aparelho Rota-rod (AVS[®], Brazil).

4.4.3.7. Teste da peritonite induzida por carragenina

A peritonite induzida em camundongos pela administração i.p. de carragenina é um modelo de inflamação aguda amplamente utilizado na pesquisa de fármacos anti-inflamatórios. A administração i.p. de carragenina induz a migração de leucócitos para o local, cuja quantificação permite avaliar a influência de fármacos no desenvolvimento deste parâmetro de resposta inflamatória, sendo particularmente sensível a anti-inflamatórios esteroidais. Além disto, a presença de vários mediadores inflamatórios pode ser avaliada e dosada no exudato inflamatório (LAPA et al., 2008).

Os camundongos (n = 6, por grupo) receberam via i.p. do ERMA, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. O grupo controle recebeu o veículo e meia hora após a administração do ERMA, 0,25 mL de carragenina (1% em salina) foram injetados via i.p. nos animais. Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, sendo injetados na cavidade peritoneal 3 mL de solução fisiológica contendo EDTA com auxílio de uma agulha 13×4 a fim de promover o mínimo trauma na vasculatura peritoneal. Massageou-se o abdômen do animal para homogeneizar o lavado. Com pipeta Pasteur, colheu-se o lavado. Em seguida, foi realizada a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer (LAPA et al., 2008).

5. Análise estatística

Os resultados obtidos nos diversos experimentos foram tratados estatisticamente usando o Programa GraphPad Prism 3.0[®] através de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido de Teste de Tukey, conforme o caso. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$, sendo todos os valores apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

6. Resultados e Discussão

6.1 Triagem fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes que possam estar relacionados às atividades biológicas encontradas e podendo validar o uso popular da mesma, além de identificar possíveis princípios ativos tóxicos.

A triagem fitoquímica do ERMA mostrou a presença das seguintes classes de compostos como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Triagem fitoquímica do extrato seco da *Remirea maritima* Aubl.

CLASSE	PRESENÇA/AUSÊNCIA
Fenóis	+
Taninos condensados	+
Alcalóides	+
Cumarinas voláteis	+
Flavonóides	+
Saponinas	+
Triterpenos/esteróides	+
Derivados antracênicos livres	—

Estudos têm demonstrado que vários flavonóides possuem relevantes ações biológicas que previnem acidentes vasculares, sendo utilizados pela indústria farmacêutica na preparação de agentes vasodilatadores como a diosmina e a rutina. Outros flavonóides como a quercetina e luteolina são abundantes na natureza e produzem significativa resposta antiinflamatória e antinoceptiva quando testados com ácido acético, formalina e capsaicina (CARVALHO, CARVALHO, 2001), além de atividade antimicrobiana, hipoglicemiante (SOUZA et al ., 2003). Ainda apresentam atividade antioxidante frente a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade capilar, a fragilidade capilar, e a atividade de enzimas, como ciclo-oxigenase e lipooxigenase (AGRA, FRANÇA, BARBOSA-FILHO, 2007). Os flavonóides exercem esses efeitos como antioxidantes, sequestradores de EROs, quelantes de cátions divalentes e como sequestrantes de peroxinitrito (HAVSTEEN, 2002; MAIA, 2008).

Os flavonóides também têm demonstrado atividade antioxidante sendo amplamente encontrados nos alimentos de origem vegetal, como frutas, vegetais, sementes, flores e folhas, fazendo parte da dieta humana (BEHERA et al., 2008; BRANDÃO, CHAVES, 2007).

Os terpenóides e compostos esteróides são largamente distribuídos no reino vegetal e exibem distintas propriedades farmacológicas. Entre outras ações, os terpenóides que ocorrem naturalmente, apresentam propriedades antiinflamatórias e antinoceptivas, inibem a agregação plaquetária e interferem a nível intracelular em vários passos do mecanismo de transdução (CECHINEL-FILHO, 2003; HOLETZ et al., 2002). O isolamento e identificação de vários terpenos com efeito antinoceptivo, antiinflamatório, antimicrobiano, antiparasitário, tripanomicida, larvicida, hipoglicemiante tem sido demonstrado em estudos preliminares (ANDRADE, 2007).

De acordo com Schmitt e colaboradores (2003), as propriedades farmacológicas (bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral e moluscicida) dos taninos são devido às suas características de complexação com íons metálicos como ferro, manganês, vanádio, cobre e cálcio e pela habilidade de complexar com outras moléculas como proteínas e polissacarídeos. O efeito inibitório dos taninos sobre bactérias pode ser explicado por inibição de enzimas microbianas e/ou complexação com os substratos enzimáticos, ação sobre as membranas celulares dos microorganismos ou complexação com íons metálicos diminuindo, assim, a disponibilidade desses elementos essenciais para o metabolismo dos microorganismos.

6.2 Atividade antimicrobiana

No presente estudo, a atividade antimicrobiana do ERMA foi determinada pela leitura do diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano, concentração inibitória mínima e concentração microbicida mínima. Os diâmetros iguais ou superiores a 10 mm foram considerados como suficientes para indicar atividade antibacteriana do produto usado, uma vez que esse foi aplicado em poços ou discos de diâmetro equivalente a 6 mm .

O critério utilizado para classificação da atividade do extrato foi: CIM menor que 100 µg/mL foi considerado com boa atividade antimicrobiana; quando o CIM estiver entre 100 a 500 µg/mL foi considerado moderadamente ativo e CIM maiores que 1000 µg/mL inativo (HOLETZ et al., 2002 ; PRETTO et al , 2004).

O ERMA apresentou atividade frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas testadas, apresentando halos de inibição variando de 15 mm a 26 mm. Além disso, apresentou

valores de inibição entre 25 mg/mL e 0,045 mg/mL, confirmando os resultados qualitativos obtidos pelo teste de difusão em Agar (Tabela 2 e 3).

Com os resultados obtidos, observou-se que 100% dos microrganismos testados foram sensíveis ao ERMA, sendo que entre as Gram-positivas mostrou-se mais efetivo para *Bacillus subtilis* (0,045 µg/ml), *Streptococcus agalactiae* (0,045 µg/ml), *Streptococcus pyogenes* (0,045 µg/ml) e *Staphylococcus aureus* (0,19 µg/ml) (Tabela 2). A elevada sensibilidade do gênero *Staphylococcus* ao ERMA demonstrado nesse estudo é relevante tendo em vista que são bactérias geralmente refratárias à terapia por agentes antimicrobianos devido a crescente multiressistência (ANDRADE, 2008).

Tabela 2. Determinação da atividade antimicrobiana em difusão em poços, Concentração Inibitória Mínima do ERMA contra bactérias Gram-positivas.

MICRORGANISMOS	ZONA DE INIBIÇÃO	CIM
	(mm)	(µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC14579)	22	0,045
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC11778)	20	0,19
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 27858)	22	0,09
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 14815)	22	0,39
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 15820)	20	0,78
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 13813)	20	0,045
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 14279)	20	0,045
<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> (ATCC 5033)	26	0,19

As informações obtidas neste estudo podem direcionar a procura pelo composto ativo responsável pela ação antibacteriana evidenciada que deve estar entre os grupos de metabólitos detectados (taninos e flavonóides).

Os trabalhos publicados sobre as substâncias oriundas de plantas, envolvidas com a atividade antimicrobiana, têm demonstrado que estas podem pertencer a diversas classes de compostos, onde entre eles destacam-se: grupos fenólicos simples e ácidos fenólicos; as quinonas; as flavonas, flavonóides e flavonóis; os taninos; as cumarinas; os terpenóides; os alcalóides; as lecitinas e polipeptídios (CHAH et al., 2006; CABRAL, 2008). Outros compostos têm sido relatados pelas suas propriedades antimicrobianas, entre eles destacam-se

as poliaminas (em particular a espermidina), os isotiocianatos, os tiosulfatos e os glicosídeos (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006 ; AGRA et al, 2007).

A presença de taninos parece estar diretamente relacionada com a atividade antimicrobiana. Nesse sentido, Maia (2008) testou frações de extratos aquosos e acetônicos da família Cyperaceae, os quais demonstraram ter atividade antimicrobiana principalmente para Gram-positivos; e depois de eliminar o tanino do extrato, através da coluna poliamida, a fração resultante foi inativa frente as bactérias testadas.

A análise da atividade antibacteriana do ERMA contra os gêneros bacterianos Gram-negativos mostrou que o ERMA foi mais efetivo contra *Neisseria gonorrhoeae* (6,25 µg/ml) e *Citrobacter sp.* (6,25 µg/ml), seguido da *Klebsiella pneumoniae* (12,5 µg/ml), *Serratia marcencens* (12,5 µg/ml), *Escherichia coli* (12,5 µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (25 µg/ml) e *Acinetobacter baumanii* (25 µg/ml) (Tabela 3). Esses resultados validam o conhecimento popular uma vez que esse grupo bacteriano está envolvido em um grande número de doenças infecciosas e, sendo o extrato utilizado na forma de infusão para inflamações e infecções, a atividade demonstrada nesse trabalho vem comprovar essas propriedades.

Tabela 3. Determinação da atividade antimicrobiana em difusão em poços e concentração inibitória mínima (CIM) do ERMA contra bactérias Gram-negativas.

MICRORGANISMOS	ZONA DE INIBIÇÃO(mm)	MIC(µg/ml)
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 14273)	16	12,5
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (ATCC 14028)	20	6,25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	16	25,0
<i>Serratia marcencens</i> (ATCC 30080)	18	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	15	25,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 35032)	16	12,5
<i>Acinetobacter baumanii</i> (ATCC 27856)	15	25,0
<i>Citrobacter sp.</i> (ATCC 35038)	16	6,25

A diferença encontrada na sensibilidade entre espécies Gram-positivas e Gram-negativas testadas para o ERMA se deve provavelmente as diferenças existentes na

composição celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, já que estas últimas têm uma parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos, ainda esse grupo de bactérias possui um teor lipídico maior que as Gram-positivas (GODOY, 2008).

Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem o espaço periplasmático, onde podem ser encontradas enzimas que inativam alguns antibióticos, como por exemplo, os beta-lactâmicos, nucleases, proteases, entre outras (TAVARES, WALTER, 1996; SCHMITT et al., 2003).

Também tem sido demonstrado que as bactérias, sobretudo as Gram-negativas, possuem mecanismos especializados para retirar substâncias estranhas do citoplasma da célula, mecanismo esse chamado de bomba de efluxo. Esse sistema previne o acúmulo de fármacos no interior da célula, evitando assim que o agente antimicrobiano atinja a quantidade necessária para tornar o ambiente letal à célula, não exercendo o seu efeito (CLARKE et al., 2001; CHAVES et al., 2002).

Em muitos estudos que constam resultados referentes à atividade antibacteriana de produtos naturais pelo método de difusão em ágar, o diâmetro do halo de inibição tem sido usado como fator classificatório do efeito antibacteriano encontrado, isto é, dependendo do diâmetro do halo de inibição obtido, os extratos são classificados por faixas como tendo boa, moderada, fraca, muito fraca ou nenhuma atividade (DEGÁSPARI, WASZCZNSK, PRADO, 2005). Muitos autores ainda comparam as zonas de inibição de crescimento de extratos de produtos naturais com aquelas obtidas por antibióticos de referência (BARBOSA, 2008).

Godoy (2008) avaliou a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da folha e caule de alguns extratos e frações da *Lentinula edodes* contra bactérias Gram-negativas através do método de disco difusão em Agar e a determinação da CIM em meio sólido, e o extrato possuiu atividade para todas as bactérias testadas.

Suffredini e colaboradores (2004) demonstraram que extratos acetônicos e purificados do *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae), tanto pelo método difusão em ágar com disco como no método de diluição em microplacas para a determinação da concentração inibitória mínima, tiveram ação inibitória para *S. aureus* e *B. Subtilis*, mas não apresentaram atividade para *E.coli* e *P. Aeruginosa*.

Loquercio et al. (2005) demonstraram que o extrato hidroalcoólico a 10% de folhas de Jambolão (*Syzygium cumini* L. pelo método de difusão em agar com disco inibiu o crescimento de todas as bactérias testadas, tanto gram-positivas como Gram-negativas.

Com relação a atividade bactericida, o ERMA também mostrou-se ativo, tanto em Gram-positivas como nas negativas, requerendo concentrações entre 0,045 e 25 µg/ml para inviabilizar o crescimento bacteriano (Tabela 4). Antimicrobianos de uso clínico são ativos contra microrganismos sensíveis em concentração de até 10 µg/ml. No entanto, com relação à atividade bactericida não há relatos na literatura sobre essa família.

Tabela 4. Determinação da atividade bactericida mínima do ERMA contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

MICRORGANISMOS	CMM (µg/ml)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 11778)	0,19
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 27858)	0,09
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 30080)	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 35032)	12,5
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 27856)	25
<i>Citrobacter sp.</i> (ATCC 35038)	6,25
<i>Streptococcus agalactiae</i> (ATCC 13813)	0,045
<i>Enterococcus faecium</i> (ATCC 14815)	0,39
<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 15820)	0,78
<i>Providencia sp</i> (ATCC 14279)	6,25
<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC 35033)	12,5

6.3. Atividade antioxidante

Devido a grande quantidade de constituintes químicos presentes na espécie foi também investigado um possível efeito antioxidante do extrato.

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia de ácidos graxos poliinsaturados mediada por radicais livres e iniciada por processos ambos enzimáticos e não-enzimáticos nas membranas celulares (MARNETT, PLASTARAS, 2001; BUETTNER, 1993). A ocorrência da lipoperoxidação induz perturbações estruturais nas membranas alterando a sua integridade, fluidez e permeabilidade e perda funcional podendo, inclusive, levar à lise celular (NIKI, 2009). Pelo fato da LPO *in vivo* ter sido implicada com mecanismos subjacentes em numerosas desordens e doenças como doenças cardiovasculares, câncer, distúrbios neurológicos, e envelhecimento, torna-se extremamente importante avaliar a atividade antioxidante de compostos exógenos para utilizá-los como profiláticos destas patologias, ou mesmo como adjuvantes em procedimentos terapêuticos (AMAROWICZ et al., 2004).

Nesse sentido, o primeiro estudo a ser realizado foi a lipoperoxidação *in vitro*, no qual foi observado que houve alta redução de lipoperoxidação (Figura 9), assim, pode-se sugerir que o ERMA possui uma significativa atividade antioxidante ($p < 0,05$) na concentração de 100 µg/mL quando comparado com o sistema, a diferença foi de 12,18%. Na concentração de 1 mg/mL a diferença estatística foi $p < 0,001$, com diferenças nas médias de 47,97%.

Os compostos fenólicos, diminuíram acentuadamente a taxa de formação de conjugado dieno (ANETA, JAN, RENATA, 2007), desta forma reduzindo a formação de malondialdeído (MDA), que reage em meio ácido com o ácido tiobarbitúrico na proporção de 2:1 formando um éster com absorção característica em 532 nm (OHKOWA, OHISI, YAGI, 1979). Achados da literatura mostram que as plantas medicinais que apresentam redução da lipoperoxidação a partir de 10 µg/ml são consideradas com alta atividade antioxidante (ANDRADE et al, 2007 ; SOUZA et al. , 2007).

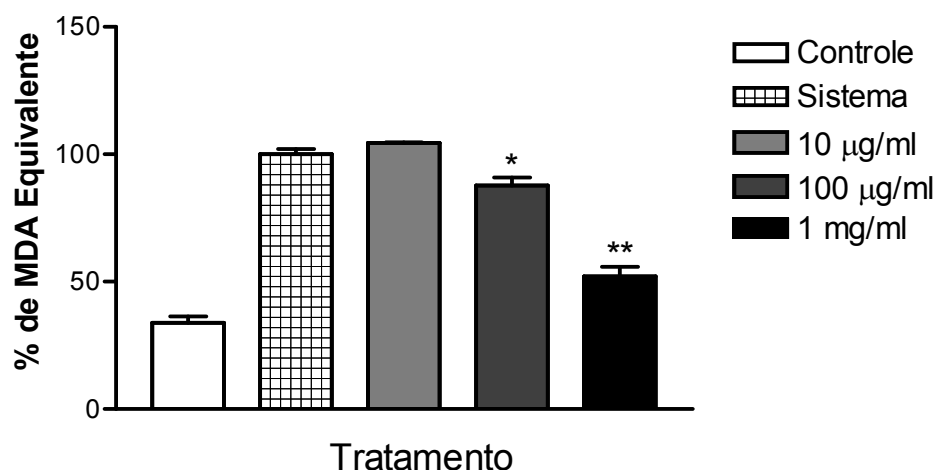


Figura 9: Efeito do ERMA frente à lipoperoxidação lipídica *in vitro*. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. ** $p < 0,001$ vs sistema (ANOVA seguida do teste de Tukey).

As observações descritas acima motivaram também a investigação da capacidade do extrato em “scavenger” de radical NO.

Nesse teste o ERMA reduziu de forma significativa ($p < 0,001$) a formação de NO nas concentrações de 100 µg/ml ($73,6\% \pm 1,3$) e 1 mg/ml ($62,3\% \pm 2,8$), ao contrário do observado no sistema ($100,0\% \pm 2,0$) (Figura 10).

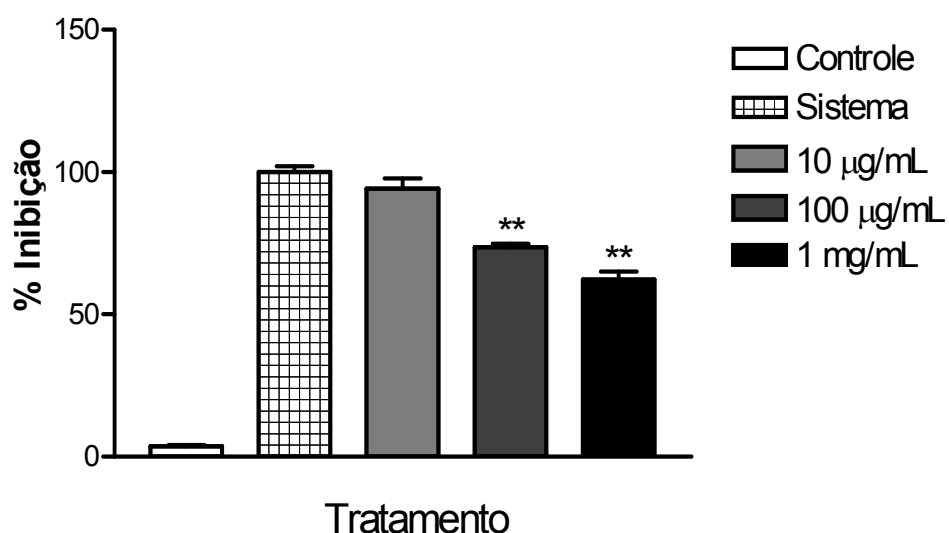


Figura 10 : Efeito antioxidante do ERMA frente ao NO. valores representam a média $\pm$ E.P.M. ** $p < 0,001$ vs sistema (ANOVA seguida do teste de Tukey).

Considerando-se o crescente uso de substâncias naturais na terapêutica e a importância de processos geradores de radicais livres em organismos vivos e a participação do óxido nítrico nesses processos fisiológicos e patológicos, tais como a inflamação, a capacidade apresentada pelo extrato em inibir a produção de EROs torna-se de fundamental relevância, sobretudo também por ter se isolado na triagem compostos como os flavonoides que atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (CSÁNYI et al., 2009).

Nesse contexto, uma vez que o óxido nítrico mantém significativa associação com a destruição tecidual mediada pelos processos inflamatórios o ERMA pode também vir a apresentar um potencial efeito antiinflamatório.

Sabe-se também que o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) é a espécie mais reativa encontrada em meios biológicos, reagindo no próprio sítio onde foi gerado, sendo responsável por grande parte dos danos celulares provenientes das EROs, causando quebras na estrutura do DNA, lipoperoxidação de membranas e também, oxidação protéica (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2009). Os efeitos dos EROs sobre os sistemas biológicos têm estado em evidência nos últimos anos, especialmente nas doenças relacionadas com o aumento destas espécies reativas no organismo e ao envelhecimento precoce. Várias pesquisas têm demonstrado a participação dos radicais livres na etiologia de algumas patologias de elevada incidência na população ocidental. Assim, qualquer substância que demonstre ter capacidade de neutralização destes radicais, torna-se um alvo importante, já que pode prevenir ou amenizar os problemas causados pelo excesso de espécies redox-ativas no organismo (CARBONARI, 2006).

Nesse sentido, para determinar se ERMA poderia, de alguma forma, afetar a formação ou os efeitos deste radical, utilizou-se um método de geração de $\cdot\text{OH}$ que se baseia na oxidação da 2 desoxirribose provocada por $\cdot\text{OH}$, produzido pela reação de H₂O₂ com o ferro. A porcentagem de inibição do radical hidroxil do ERMA demonstrou uma redução de 49,27% e 77,45% para as concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1mg/mL, respectivamente (Figura 11).

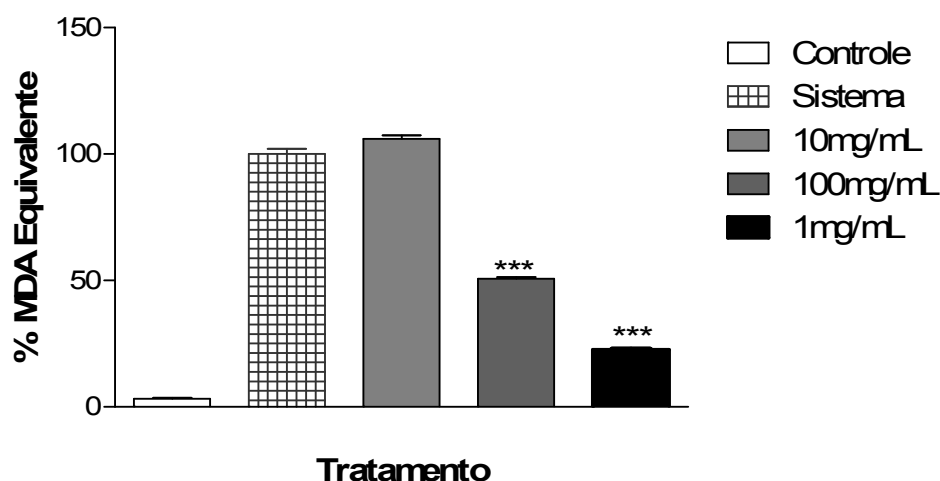


Figura 11- Capacidade *scavenger* de radical hidroxila pelo ERMA. Os valores representam a média $\pm$ E.P.M. ; *** $p < 0,001$. vs sistema (ANOVA seguida do teste de Tukey).

Os constituintes polifenólicos, particularmente os flavonóides, representam uma forma importante de defesa antioxidante devido a seus efeitos quelantes sobre metais. É possível que o ERMA possua um efeito quelante sobre íons metálicos, especialmente de íons Fe^{2+} , que são capazes de gerar EROs (peróxidos que, a propósito, estão implicados em muitas doenças incluindo as inflamatórias), a partir da reação de Fenton. Através da diminuição das concentrações biodisponíveis de Fe^{2+} , estas substâncias podem proteger as células contra o dano oxidativo (KVIECINSKI, 2008; BARBOSA, 2008).

Logo capacidade do extrato em eliminar os radicais hidroxila parece estar diretamente relacionada à prevenção da propagação do processo de peroxidação lipídica e parece ser “scavenger” de espécies reativas de oxigênios, reduzindo assim a taxa de reações em cadeia. Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de compostos isoladas da espécie *Remiria maritima* Aubl.

6.4 Atividade antinociceptiva

Vários fármacos antiinflamatórios têm mostrado um mecanismo antioxidante como parte de sua atividade biológica e como o extrato demonstrou um potencial antioxidante em todos os testes realizados, resolveu-se então testar sua atividade antiinflamatória.

Nesse sentido, o primeiro teste a ser verificado foi o das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético a 0,9% onde foi registrado que o ERMA em todas as doses testadas (100, 200, 400 mg/kg) apresentou efeito antinociceptivo quando administrado por via ip., com percentuais de inibição de 32,1, 34,5 e 49,5% respectivamente. O ácido acetilsalicílico exibiu significativa inibição (88,9%, $p < 0,001$) sobre as contorções abdominais, quando comparada ao grupo controle (Figura 12).

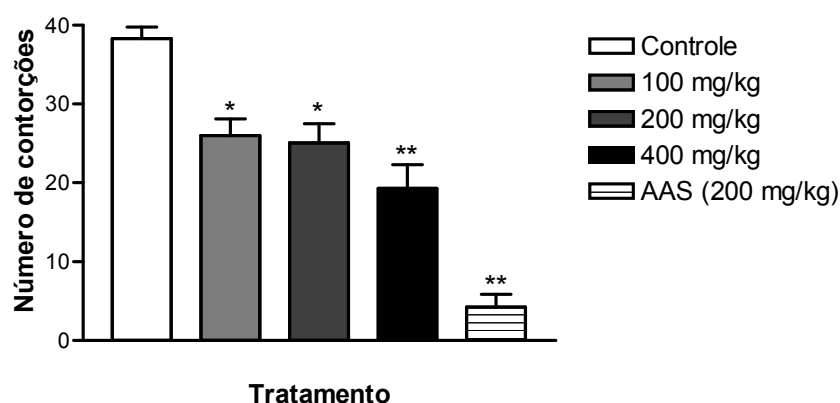


Figura 12. Efeito do ERMA no comportamento nociceptivo de camundongos no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,9%. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$, em relação ao grupo controle. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($n = 6$, por grupo).

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético tem sido amplamente utilizado como ferramenta de triagem na busca por novos agentes analgésicos e antiinflamatórios, pois permite avaliar uma reação comportamental que pode ser considerada um reflexo de dor visceral inflamatória (SILVA et al, 2005; KVIECINSKI, 2008).

No entanto, este método apesar de ser considerado bastante sensível por permitir a identificação de substâncias com baixo poder analgésico, é também pouco específico. Em parte, isto se deve ao fato de o teste ser sensível a substâncias com ação antinociceptiva que agem tanto no SNC, quanto no sistema nervoso periférico dificultando qualquer tipo de distinção (LE BARS et al., 2001). O ácido acético atua indiretamente no fluido do peritônio,

provocando liberação de mediadores endógenos, aumentando principalmente os níveis de prostaglandinas (PGE^2 e $\text{PGF}2\alpha$), sensibilizando e posteriormente estimulando as terminações neuronais dessa região. De modo geral, as drogas analgésicas reduzem ou mesmo inibem esse comportamento. Contudo outras drogas, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), opióides e outras substâncias podem inibir o número de contorções, demonstrando dessa forma a baixa especificidade do teste (LE BARS et al., 2001). Por esta razão, a interpretação da redução da resposta álgica através do estímulo pelo ácido acético, deve ser efetuada de forma cautelosa e em conjugação com outros testes. Assim, de acordo com os dados apresentados anteriormente e com os autores citados acima, pode-se sugerir que os resultados obtidos nesse teste são decorrentes de um efeito antinociceptivo do ERMA devido a uma possível inibição dos mediadores do processo inflamatório.

A fim de se obter evidências mais específicas sobre a atividade antinociceptiva do ERMA, foram realizados outros testes de nocicepção induzida por estímulos químicos. Entre estes, encontra-se o teste da formalina, que é um teste clássico de nocicepção, sensível às diferentes classes de substâncias antinociceptivas. O teste, é considerado um modelo de dor persistente, produzido pela administração intraplantar da substância a 1%, que causa a estimulação de nociceptores, podendo ser considerado um modelo bifásico de comportamentos indicativos de dor (dor neurogênica e dor inflamatória) (HUNSKAAR, HOLE, 1987; ALMEIDA, 2006)..

A primeira fase ocorre após 5 minutos da injeção e provavelmente, é resultante da estimulação direta de nociceptores; a inibição dessa fase é indicativa de drogas analgésicas de ação central. Em seguida há um período de quiescência que dura aproximadamente 10 minutos e resulta de uma ativação de mecanismos inibitórios da dor. Na sequência, ocorre uma segunda fase com duração de 15 minutos, gerada tanto pela estimulação dos nociceptores como pela liberação de mediadores inflamatórios. Além de drogas que atuam em nível central, as antiinflamatórias interferem nessa etapa (HUNSKAAR, HOLE, 1987; ALMEIDA, 2006).

O teste da formalina produz um estímulo nociceptivo de caráter tônico e moderado, que persiste por alguns minutos, e do qual o animal não pode se esquivar. Portanto, costuma-se associar este modelo ao que mais se assemelha à condição clínica de dor, sendo um modelo útil para a investigação de fármacos analgésicos em potencial (TJOLSEN et al., 1997; FREITAS, 2009). Nesse teste, nenhuma dose do ERMA não foi capaz de reduzir a resposta antinociceptiva na primeira fase. Entretanto, na segunda fase, o ERMA (200 e 400 mg/kg)

produziu uma redução significativa do tempo de lambida da pata ($p < 0,05$ e $p < 0,001$), com percentual de inibição de 43,2 e 61,9 %, respectivamente (Figura 13).

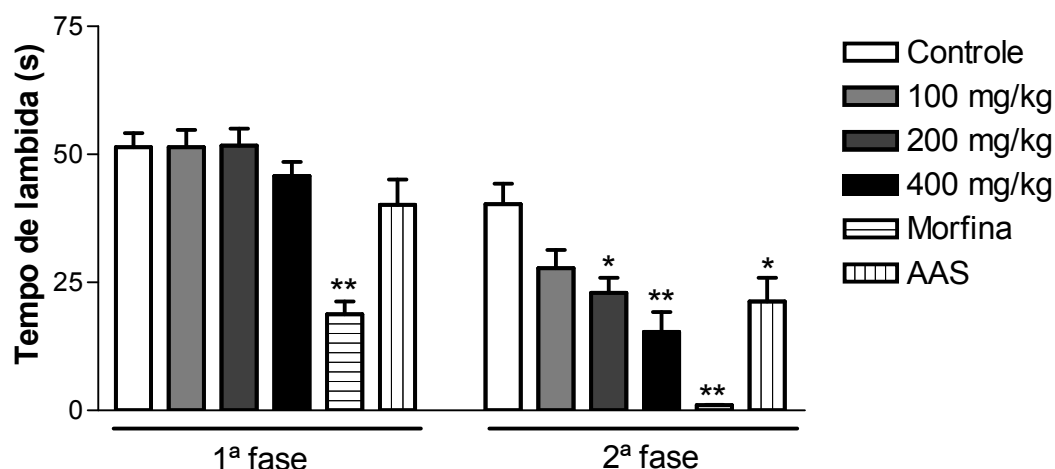


Figura 13. Efeito do pré-tratamento do ERMA no comportamento nociceptivo de camundongos no modelo de nocicepção induzido pela formalina. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($n = 6$, por grupo).

Estudos prévios têm demonstrado que a formalina age liberando vários mediadores inflamatórios, apresentando duas fases: uma neurogênica (1ª fase) e uma fase inflamatória (2ª fase) (HUNSKAAR, HOLE, 1987; ROCHA et al., 2007). Neste estudo observou-se que o ERMA, quando administrado por via i.p., produz inibição apenas sobre a 2ª fase (fase inflamatória). A inibição da nocicepção na 2ª fase sugere uma provável ação antiinflamatória do extrato, que apresenta a partição efetiva de mediadores pró-inflamatórios, indicando que o extrato atua de forma periférica, semelhante aos AINES que são eficazes contra dor leve e moderada, como também pode estar havendo uma inibição dessa fase através da ação de substâncias antioxidantes, corroborando assim com os resultados dos testes anteriores, assim como o de contorções abdominais.

Buscando descartar um possível envolvimento central no efeito antinociceptivo do ERMA realizou-se o teste da placa quente. O teste da placa quente produz dois componentes comportamentais ambos são considerados respostas supra-espinhais integradas que podem ser medido em termos dos seus tempos de reação, ou seja, lambida da pata e salto. O estímulo térmico do teste da placa quente é utilizado para estudar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais. É um modelo animal que avalia a atividade antinociceptiva de fármacos

opióides, mas outras drogas com atividade central, tais como sedativas e hipnóticas mostram atividade no modelo da placa quente (ROCHA, 2007; FREITAS, 2009).

Considera-se que a resposta observada nesse modelo resulta da ativação direta de nociceptores pelo calor e depende de integração supra-espinhal. Analgésicos opióides, bem como drogas de ação predominantemente central, como antidepressivos tricíclicos e antiepilépticos, aumentam o tempo de permanência dos animais na placa quente, um resultado que é interpretado como antinocicepção. A Figura 14 mostra os efeitos do ERMA via i.p., sobre o teste da placa quente, em que o ERMA não produziu redução significativa no comportamento nociceptivo, descartando o possível efeito central do ERMA.

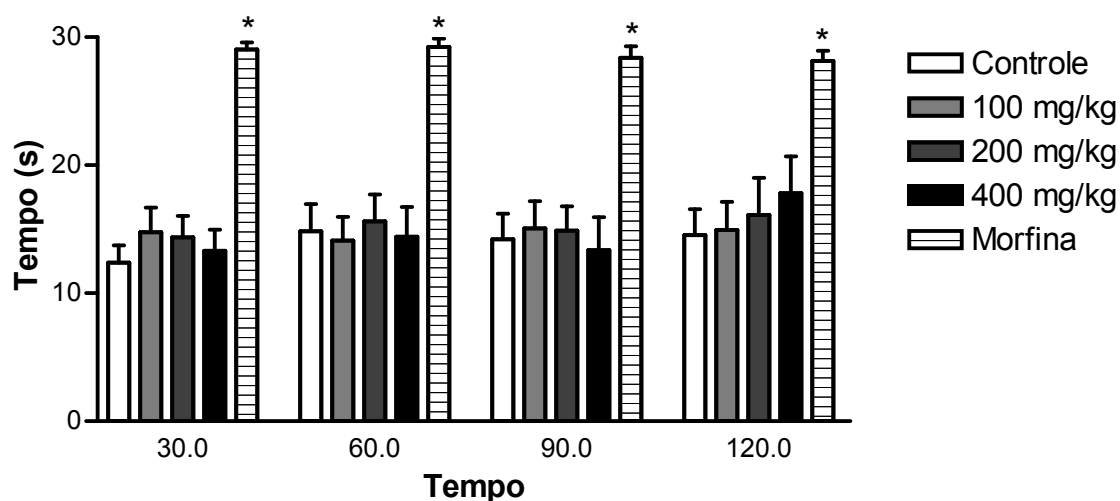


FIGURA 14: Efeito do ERMA no comportamento nociceptivo de camundongos no teste da placa quente. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, $*p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($n = 6$, por grupo).

Ao se investigar experimentalmente o efeito de uma substância em modelos animais, cujo parâmetro analisado se manifeste através de uma resposta comportamental, é necessário se investigar também a possibilidade desta substância produzir efeito sedativo ou relaxante-muscular. No caso da nocicepção, a integridade da função locomotora é necessária para que o animal consiga produzir a resposta comportamental de acordo com a intensidade do estímulo aplicado (LE BARS et al., 2001).

A Figura 15 mostra que, os mesmos, quando tratados com ERMA não exibiram alteração significativa da coordenação motora nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Como já era esperado, o diazepam (DZP 1,5 mg/kg), reduziu o tempo de permanência dos animais no Aparelho “Rota rod ” ($63,3 \pm 11,4$ s) quando comparado com os animais do grupo teste , 30 e 60 minutos após o tratamento.

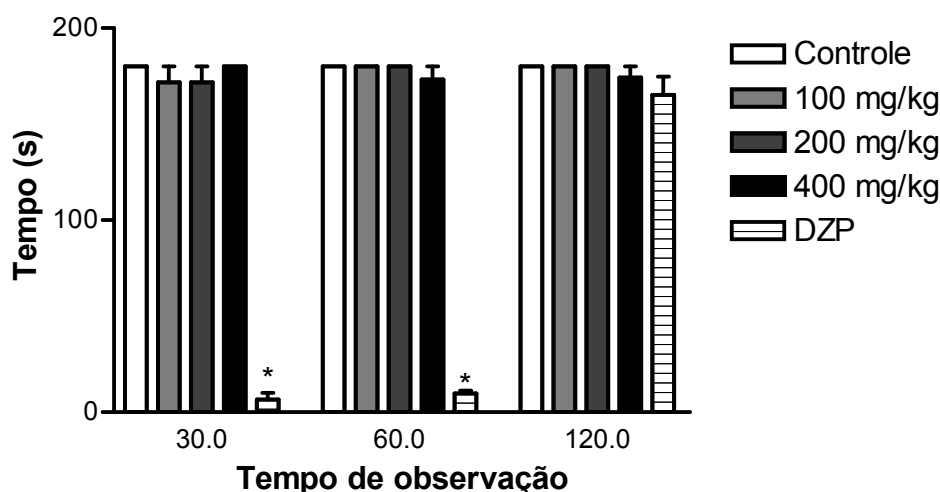


Figura 15: Efeito do ERMA no teste da coordenação motora. Cada coluna representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($n = 6$, por grupo).

Os resultados encontrados sugerem que o ERMA pode está atuando via dor inflamatória. Nesse sentido, diversos modelos de inflamação têm sido utilizados para avaliar o potencial antiinflamatório de alguns produtos naturais. Isto se deve ao fato de que, apesar da maioria das reações inflamatórias apresentarem características comuns, sua etiologia e manifestações clínicas diferem significativamente, necessitando, portanto, de modelos específicos que reproduzam as características básicas. Desta forma é fácil compreender porque os modelos experimentais relativos ao tratamento de doenças inflamatórias são deveras diversificados (SEDGWICK, WILLOUGHBY, 1989; DEREK et al., 1999; BATISTA et al., 2005).

Protocolos experimentais nos quais o processo inflamatório é induzido agudamente, têm sido utilizados para estudos desta reação, abordando a participação de mediadores químicos de diferentes tipos celulares, além de possibilitar a avaliação de fármacos com suposta atividade antiinflamatória. Entre os modelos mais utilizados para avaliação da atividade anti-inflamatória pode-se citar: indução de edema de pata, pleurisia, bolsa de ar no

dorso e teste da medida da peritonite induzida por carragenina (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1989; LORAM et al.; 2007).

O teste da medida da peritonite induzida por carragenina em camundongos caracteriza-se pela injeção intraperitoneal de um polissacarídeo de origem marinha, que gera um quadro de inflamação aguda e é caracterizado pela liberação sequencial de mediadores inflamatórios. Segundo Geremias (2004), a técnica da peritonite possui algumas vantagens, pois a partir da coleta do lavado na cavidade pleural, é possível analisar e quantificar os componentes celulares e humorais da inflamação, sem necessitar recorrer a procedimentos complicados na sua extração e quantificação. Uma outra vantagem adicional da peritonite é a sua fácil execução, visto que diferentes agentes flogísticos (específicos e não específicos) podem ser estudados. De modo geral, a inflamação produzida pelo modelo da peritonite é lenta e prolongada e pode avaliar não só o extravasamento de líquido, como também a migração celular, além da participação de citocinas, enzimas e mediadores químicos através da utilização de diferentes agentes flogísticos (CARBONARI, 2006; LORAM et al.; 2007).

A Figura 16 mostra que o ERMA inibiu a migração leucocitária induzida por carragenina nas doses de 100 ($8,9 \pm 0,1$; $p < 0,01$), 200 ($6,6 \pm 0,2$; $p < 0,01$) e 400 mg/kg ($3,9 \pm 0,6$; $p < 0,01$) e um possível mecanismo associado a essa atividade pode ser a inibição da síntese de muitos mediadores inflamatórios envolvidos na migração celular.

A inflamação induzida por carragenina envolve a migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, como o óxido nítrico, prostaglandina E_2 , interleucina (IL)- 1β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (SALVEMINI, DOYLE, CUZZOCREA, 2006; LORAM et al., 2007). Estes mediadores são capazes de recrutar leucócitos, tais como neutrófilos, em vários modelos experimentais.

As células inflamatórias são responsáveis pela eliminação do agressor na área afetada, porém o aumento de células inflamatórias pode causar dano tissular, eliminando proteínas plasmáticas importantes no processo de reparo tecidual. Desta forma, a modulação do aparecimento de células inflamatórias na área lesada é uma atividade importante para um medicamento antiinflamatório (ZIEGLER-HEITBROCK, 2007).

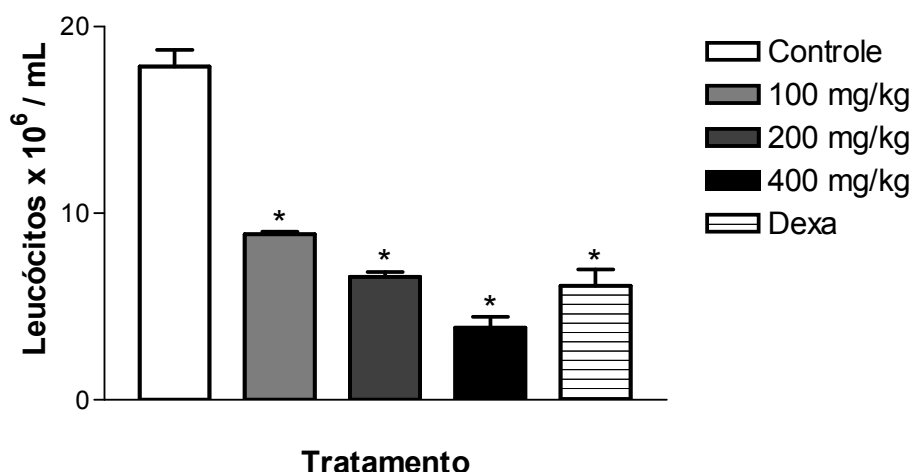


Figura 16. Efeito da administração i.p. do veículo (controle), ERMA (100, 200 e 400 mg/kg) e dexametasona (2 mg/kg) na inflamação aguda induzida por carragenina, medida pelo número de leucócitos totais no fluido peritoneal (peritonite). Cada grupo representa média ± E.P.M. * $p < 0,001$ quando comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Tukey; $n = 6$, por grupo).

Os resultados sugerem que o ERMA possui atividade antinociceptiva e antiinflamatória, provavelmente mediado via inibição de mediadores periféricos (como a síntese das prostaglandinas), podendo estar também, como já foi descrito relacionado com a liberação da interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), dois mediadores importantes no processo inflamatório, que são capazes de induzir a produção de EROs (FREITAS, 2009). A ativação de células endoteliais também gera EROs e contribui significativamente para a manutenção de um ambiente oxidante no sítio inflamatório, podendo assim a inflamação estar sendo inibida possivelmente por substâncias antioxidantes presente no extrato como foi observado.

Assim, todos os resultados encontrados dão suporte ao uso popular da *Remirea maritima*, contudo, um extenso estudo toxicológico e uma melhor compreensão dos mecanismos farmacológicos envolvidos são requeridos.

7. CONCLUSÕES

- No ERMA foi identificado as seguintes classes de compostos: taninos condensados, alcalóides, cumarinas voláteis, saponinas e triterpeno
- O ERMA apresentou um grande potencial antimicrobiano e bactericida.
- O ERMA apresentou uma forte ação antioxidante *in vitro*.
- O ERMA apresentou atividade antinociceptiva, provavelmente mediada por mecanismos periféricos.
- O ERMA não altera , nas doses testadas, a coordenação motora dos animais.
- O ERMA apresentou atividade antiinflamatória induzida por carragenina nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, possivelmente por inibir a quimiotaxia.

8. CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS

- Realizar um extenso estudo fitoquímico, através de isolamento e identificação de metabólitos secundários.
- Estudar os mecanismos farmacológicos envolvidos nas atividades biológicas apresentadas.
- Avaliar preparações com ERMA para atividade cicatrizante.
- Investigar o mecanismo de ação do ERMA apresentado na atividade antimicrobiana.
- Avaliar uma possível atividade antiedematogênica através do teste de edema de pata induzido por ácido araquidônico.
- Desenvolver uma metodologia analítica de quantificação dos marcadores visando o controle de qualidade da matéria prima e produtos derivados.
- Estudar a toxicidade do extrato da planta.

9. 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 Farmacognesia**. volume: 17, página:114-140, 2007.

ALMEIDA, R. N ; FALCÃO, A. C. G. M, DINIZ, R. S. T, QUINTANS-JÚNIOR L. J. ; POLARI, R. M. ; BARBOSA-FILHO, J. M. ; AGRA, M. F ; DUARTE J. C. ; FERREIRA C. D.; ANTONIOLLI, A. R ; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognesia**. volume: 80, página: 72-76, 1999.

ALMEIDA R.N, MOTTA S.C, FATURI, C.B, CATALANI B, LEITE J.R. Anxiolytic-like effects of rose oil inhalation on the elevated plus-maze test in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. volume : 77, página: 361–364, 2004.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos**. 1 edição. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006.

ALVES, E. G. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia fallax*. Estudo comparativo de quatro técnicas de "screening"**. Franca. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Biológica) Universidade de Franca, 2006.

AMAROWICZ, R. ; PEGG, R. B. ; RAHIMI-MOGHADADAM, P. ; BARL, B. ; WEIL, J. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant capacity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**. Volume: 84, página: 551-562, 2004.

ANDRADE, C. A. ; COSTA, C. K. ; BORA, K. ; MIGUEL , M. D. ; MIGUEL, O. G. ; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante da *Acácia podalyriifolia* . **Revista Brasileira de Farmacognesia**. volume: 17, página: 231-235, 2007.

ANDRADE, L. L. **Prevalência de *Staphylococcus aureus* em estudantes universitários com e sem contato com o ambiente hospitalar.** Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Microbiologia: Instituto Prof. Paulo de Góes), 2008.

ANDREO, D. ; JORGE, N. **Antioxidantes Naturais: Técnica de Extração.** Curitiba, volume: 24, página: 319-336, 2006.

ANETA, W. ; JAN, O. ; RENATA, C. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry.** volume: 105, Página: 940–949, 2007.

APOSTOLAKIS, S. ; YHLIP, G. ; SHANTSILA, E. Monocytes in heart failure: Relationship to a deteriorating immune overreaction or a desperate attempt for tissue repair. **European Society of Cardiology.** volume: 85, página: 649-660, 2009.

BAJT, M. L ; KNIGHT, T. R ; FARHOOD, A. ; JAESCHKE, H. Scavenging peroxynitrite with glutathione promotes regeneration and enhances survival during acetaminophen-induced liver injury in mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.** volume: 307, página: 67-73, 2003.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobianas, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* ST. Hill (Anacardiaceae).** Dissertação (Universidade Federal de Uberlândia), 2008.

BATISTA, L. M ; FALCÃO, H. S ; LIMA, I. O ; SANTOS, V. L ; DANTAS, H.F ; DINIZ, M. F. F. M ; BARBOSA-FILHO, J. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** volume:15, página: 381-391, 2005.

BAUER, A. W. ; KIRBY, W. M. M. ; SHERRIS, J. C. ; TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal Clinical Pathology.** volume: 45, página: 493-496, 1966.

BEHERA, B. C. ; VERMA, N. ; SONONE, A. ; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured. **Bioresource Technology.** Volume: 99, página: 776-784, 2008.

BERTOLLO, C. M. **Avaliação da Atividade da Riboflavina em diferentes modelos de nocicepção e inflamação**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Minas Gerais. Tese (Dissertação parcial como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas), 2006.

BLACK, G. J. **Microbiologia Fundamentos e perspectivas**. 4ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2002.

BRANDÃO, M. S. CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. volume:30, página: 390- 394, 2007.

BOSCA, L. ; ZEINI, M. ; TRAVES, P. G ; HORTELANO, S. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. **Toxicology**. volume: 208, página: 249–258, 2005.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. volume: 300, página: 535-543, 1993.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgesic-Antipyretic Agents; Pharmacotherapy of Gout. In: Brunton, L. L. (Coord.) Goodman & Gilman's the **Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11th. edição. New York: McGraw Hill. Capítulo: 26, página: 671-715, 2006.

BURKHOLDER, P. R. ; EVANS, A. W. ; MACVEIGH, I. ; THORTON, H. R. Antibiotic activity. Proceedings of the **National Academy of Sciences of Washington**. volume: 30, página: 250-255, 1944.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e Identificação de Compostos com atividade antibacteriana de Própolis Vermelha Brasileira**. Dissertação (Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”), 2008.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Research**. volume : **33**, página: 179-189, 2000.

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

CARBONARI, K. A. ; FERREIRA, E. ; REBELLO, J. ; FELIPE, K. B. ; ROSSI, M. H. ; FELICIO, J. ; WILHELM-FILHO, D. ; YUNES, R. A. ; PEDROSA, R. C. Free-radical scavenging by *Ouratea parviflora* in experimentally-induced liver injuries. **Redox Report Edinburgh**. volume:11, página: 124-130, 2006.

CARVALHO, G. J. A. ; CARVALHO , M. E. Diterpenos, Triterpenos e Esteroides das Flores da *Wedelia paludosa*. **Química Nova**. volume: 24, página: 24-26, 2001.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Riparinas sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Multirresistentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. volume: 37, página: 247-249, 2005.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: Estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**. volume: 23, página: 680-685, 2003.

CELLOTO, A. C. ; NAZARIO, D. Z ; SPESSOTO, M. A. ; MARTINS, C. H. G. ; CUNHA, R. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. volume: 34, página: 339-40, 2003.

CLARKE, J. M. ; GILLINGS, M. R. ; ALTAVILLA, N. ; BEALE, A. J. Testing natural products for antimicrobial activity – potencial problems with fluorescein diacetate assays of cell viability. **Journal Microbiological Methods**. volume: 46, página: 261, 2001.

CHAH, K. F. ; EZE, C. A. ; EMUELOSI, C. E. ; ESIMONE, C. O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Etnopharmacology**. volume: 104, página: 164-167, 2006.

CHAVES, J. M.; MENEZES, E. A., MOREIRA; A. A., CUNHA; F. A., CARVALHO, T. M. J. P. Perfil de Sensibilidade dos Antimicrobianos utilizados em infecções urinárias do hospital de referência São Cidade de Crateús- Ceará. **Infarma**. volume: 34, página: 33-25, 2002.

CHOI, W, M ; NOHB, D. O ; CHOC, S. Y ; SUHD, H. J ; KIMD, K. M. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. volume: 163, página: 1161-1168, 2002.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Insitute). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: norma aprovada sexta edição – M7 – A6**. volume: 23, número: 2. Pennsylvania, 2005.

CONE, J. B. Inflammation. **American journal of Surgery**. volume: 182, página : 558-562, 2001.

CSÁNYI, G; TAYLOR, W. R.; PAGANO, P. J. NOX and inflammation in the vascular adventitia. **Free Radical Biology & Medicine**. volume:. 47, página:. 1254–1266, 2009.

FREITAS, C .S. ; BAGGIO, C. H. ; SANTOS, A._C. ; MAYER, B. ; TWARDOWSCHY, A. ; LUIZ, A. P. ; SOLDI, C. ; PIZZOLATTI, M._G. ; MARQUES, M._C._A. ; SANTOS, A._R._S. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (Print)**. volume:104, página: 285-292, 2009.

DASSOLER, M. ; SCHWANZ M. ; BUSSETO, F. ; MOREIRA E. A. ; GUTIERREZ L. Perfil fitoquímico e ensaio farmacológico de *Averrhoa carambola* L. (Oxalidaceae). **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. volume: 2, página: 4-8, 2004.

DEGÁSPARI, C. H. ; WASZCZNSKYJ, N. ; PRADO, M. R. M. Atividade Antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. **Ciência e Agrotecnologia**. Volume: 29, página: 617-622, 2005.

DENG, X. ; LUYENDYK, J. M. ; GANEY, P. E. ; ROTH, R. A. Inflammatory Stress and Idiosyncratic Hepatotoxicity: Hints from Animal Models. **Pharmacological Reviews**. Volume: 61, página: 262–282, 2009.

DEREK, W. ; GILROY, P. R. ; COLVILLE-NASH, D. ; WILLIS, J. ; CHIVERS, M. J. ; PAUL-CLARK, A. ; WILLOUGHBY, D. A. Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. **Nature Medicine**. volume: 5, página: 698-701, 1999.

DIAS, K. S. ; ALMEIDA, D. S. ; SILVA, A. B. L. ; MARQUES, M. S. ; MENEZES, I. A. C. ; SANTOS, T. C. ; MELO, I. C. M. ; CARVALHO, A. C. S. , ANTONIOLLI, A. R. ; MARÇAL, R. M. Avaliação dos efeitos miorelaxante, antiespasmódico e antinociceptivo do extrato aquoso da *Phoradendron piperoides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. Volume:17, página: .373-377, 2007.

DONATINI, R. S. ; ISHIKAWA, T. ; BARROS, S. B. M. ; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. volume: 19, página: 89-94, 2009.

DUH, P. D. ; TU, Y. Y. ; YEN, G. C. Antioxidative activity of water extracts of Hamgiyur (*Chrysanthemum morifolium*). **Lebensmittel Wissenschaft Technologil**. Volume: 32, página: 269–277, 1999.

FISCHER, L. G. O. **Avaliação farmacológica de extratos e substâncias obtidas de *Plinia glomerata* (Berg)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade do Vale do Itajaí, 2007.

FRANÇA, F. B. ; COSTA, A. C. Perfil Farmacoterapêutico de Pacientes em Uso de Antimicrobianos em Hospital Privado, em Fortaleza-CE. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**. Volume:19, página: 224-228, 2006.

FREITAS, C.S. ; BAGGIO, C. H. ; SANTOS, A .C. ; MAYER, B. ; TWARDOWSCHY, A. ; LUIZ, A. P. ; SOLDI, C. ; PIZZOLATTI, M. G. ; MARQUES, M. C. A. ; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract, fractions and compounds obtained from the aerial parts of *Baccharis illinita* DC in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology (Print)**. Volume: 104, página: 285-292, 2009.

GARY, I. S. ; PEDERSEN, M. E. ; VAN, J. ; JAGER, A. N. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. volume: 119, página: 513–537, 2008.

GRABLEY, S., THIERICKE, R. The impact the natural products on drug discovery. In: Grabley, S. and Thiericke, R. (Ed.). **Drug Discovery from Nature**. volume: 27, página: 30-37, 1999.

GEREMIAS, D. S. **Avaliação da atividade antiinflamatória do SSR180575, um ligante do receptor benzodiazepínico periférico, no modelo da pleurisia induzida pela carragenina, em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmácia: Universidade Federal de Santa Catarina), 2004.

GOBBO-NETO, L. ; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quimica Nova**. volume: 30, página: 374-381, 2007.

GODOY, M. F. P. ; DANIEL, J. F. S. ; RODRIGUES-FILHO, E. ; PASCHOLATI, S. F. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos de *Cyperus sublineo*. **Summa Phthopathologica**. Volume: 34, página: 171-179, 2008.

GONÇALVES, J. C. R. ; OLIVEIRA, F. S. ; BENEDITO, R. B. ; SOUZA D. P. ; ALMEIDA, R. N. ; ARAÚJO, D. M .N. Antinociceptive Activity of Carvone: Evidence of

Association with Decreased Peripheral Nerve Excitability. **Biological Pharmaceutical Bull.** volume: 31, página: 1017-1020, 2008.

GROVE, D. C. ; RANDAL, W. A. Assay Methods, Antibiotic Activity Laboratory Manual . 2 edição. **New York, Medical Encyclopedia**, 1955.

HAJHASHEMI, V. ; SAJJADI, S. E. ; HESHMATI, M. Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**. volume:124, página: 475–480, 2009.

HALLIWELL, B. ; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radical in Biology and Medicine. 5 edição. **Oxford: Oxford University**, 2009.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Farmacology & Therapeutics**. Volume: 96, página: 67-202, 2002.

HERODEZ, S. S ; HADOLIN, M. ; SKERGET, M. ; ZELJKO, K. Solvent extraction study of antioxidants from balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. **Food Chemistry**. Volume: 80, página: 275-82, 2003.

HOLETZ, F. B. ; PESSINI, G. L. ; SANCHES, N. R. ; CORTEZ, D. A. G. ; NAKAMURA, C. V. ; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswald Cruz**. Volume: 97, página: 1027-1031, 2002.

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

JABBOUR H. N, SALES K. J, CATALANO R.D, NORMAN J.E. Inflammatory pathways in female reproductive health and disease. **The Journal of the Society for Reproduction and Fertility**. Volume: 138, página: 903-919, 2009.

JULIUS D. ; BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. Volume: 413, página: 203-210, 2001.

JÜRGENSEN, S. ; DALBÓ, S. ; ANGERS, P. ; SANTOS, A. R. S. ; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M. . Involvement of 5-HT₂ receptors in antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Volume: 81, página: 466-477, 2007.

KANG, S. ; NGUYEN, T. D. ; VIVEK, B. ; JUNG, I. Y. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. **Food and Chemical Toxicology**. Volume: 47, página: 449–453, 2009.

KOSTER, R. ; ANDERSONS, M. ; DEBEER, E. J. Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**. Volume: 18, página: 418-420, 1959.

KRAYCHETE, D. C. ; CALASANS, M. T. A. ; Valente, C. M. L. Pro-inflammatory Cytokines and Pain-Review Article. **Revista Brasileira de Reumatologia**. Volume: 46, página: 199-206, 2006.

KVIECINSKI, M. R. ; BETTEGA, K. ; SCHOENFELDER, T. ; WIESE, L. P. ; ROSSI, M. H. ; GONÇALEZ, E. ; FELÍCIO, J. D. ; VAN FILHO, D. W. ; PEDROSA, R. C. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. volume: 117, página: 69-75, 2008.

LAPA A.J, SOUCCAR C. , LIMA-LANDMAN M .T, CASTRO M. S .A , LIMA T. C. M. **Plantas Medicinais: Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica**. 5 edição. Porto Alegre: Gráfica Metrópole , 2008.

LE BARS, D. ; GOZARIU, M. ; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**. Volume: 53, página: 597-652, 2001.

LOGUERCIO, A. P. ; BATTISTIN, A. ; VARGAS, A. C. De ; HERNZEL A. ; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extratos hidro-alcoólico de folhas de Cyperaceae (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**. Volume: 35, página: 371-376, 2005.

LORAM, L. C. ; FULLER, A. ; FICK, L. G. ; CARTMELL, T. ; POOLE, S. ; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Journal of Pain**. Volume: 8, página: 127-136, 2007.

MAI, G. M. C. **Avaliação do potencial antinociceptivo de novos 3-metil-1H-1-pirazol metil ésteres 5-substituídos em camundongos**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria), 2007.

MAIA, C. N. **Análise fitoquímica e atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de Plantas do Cerrado**. Dissertação(Universidade de Montes Claros), 2008.

MARCOS, O. R. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico obtido através das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – Abacateiro – Lauraceae**. Dissertação (Universidade de Franca), 2006.

MARNETT, L. J. ; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA damage and mutation. **Trends Genet**. volume:17, página:. 214-221, 2001.

MENDES, C. L. A. Triterpenoides e a sua atividade antiinflamatória. Departamento de quimica . **Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa**, Portugal, 2004.

MIGLIATO, K. F. ; BABY, A. R. ; ZAGUE, V. ; VELASCO, M. V. R. ; CORRÊA, M. A. ; SACRAMENTO, LUIS, V. S. ; SALGADO, H. R. N. . Ação Farmacológica de *Syzygium cumini* (L) Skeels. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. volume: 25, página: 310-314, 2006.

MIMS, C. ; PLAYFAIR, J. ; WAKELIN, D. ; WILLIAMS, R. ; ROITT, I. **Microbiologia Médica**. 2ªedição. São Paulo : Editora Manole Ltda, 2001.

MOMIN, A. ; WOOD, J. N. Sensory neuron voltage-gated sodium channels as analgesic drug targets. **Current Opinion in Neurobiology**. volume: 18, página: 383-388, 2008.

MORAIS, S. M. ; JÚNIOR, F. E. A. C. ; SILVA, A. R. A. NETO, J. S. M. N. ; RONDINA, D. ; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Cróton do Nordeste do Brasil. **Química nova**. Volume: 29, página: 296- 302, 2006.

NASCIMENTO, G. F. ; LOCATELLI, J. ; FREITAS, C. ; SILVA, G. L. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Brazilian Journal of Microbiology**. Volume: 31, página: 247, 2000b.

NASCIMENTO, G. G. F. ; LOCATELLI, J. ; FREITAS, P. C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Brazilian Journal of Microbiology**. Volume: 31, Página: 247-256, 2000a.

NATH, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**. Volume: 6, página: 173–182, 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**. Norma Aprovada 6 ed. Brasília, DF: ANVISA, volume: 23, número: 2, página: 586-699, 2003.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**. volume: 47, página: 469–484, 2009.

OHKOWA, M. ; OHISI, N. ; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. Volume: 95, página: 351-358, 1979.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic properties of *Hypoxis hemerocallidea* Fish & C. A. Mey. **Journal of Ethnopharmacology**. volume: 98, página: 690- 756, 2005.

OLIVEIRA, F. S ; SILVA, M. G ; QUINTANS-JÚNIOR, L. J ; OLIVEIRA, T. M. L ; DINIZ, F. F. M. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC). **Acta Farmaceutica Bonaerense**. Volume: 24, página: 533-537, 2005.

OLUGBENGA-MOREBISEA, E. O.; AWEB, J.; MODUPE, M.; OLUMAYOKUN, A. O. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chasmanthera dependens* leaf methanol extract. **Fitoterapia**. Volume: 72, página: 497-502, 2001.

PACKER, J. F. ; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira Farmacognesia**. volume: 17, página: 102-107, 2007.

PEREIRA, E. M. **Avaliação do papel de receptores NMDA para glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos**. Programa de Pós-Graduação do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. (Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia), 2006.

PRATA, A. P. ; LÓPEZ, M. G. ; SIMPSON, D. A. . New combinations in *Bulbostylis* (Cyperaceae) from South America. **Kew Bulletin**. volume: 56, página: 1007-1009, 2001.

PRETTO, J.B. ; CECHINEL- FILHO, V. ; NOLDIN, F. V. ; SaRTORI, K. M. R. ; BUFFON, D. ; CRUZ, A. B. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Journal of Biosciences**. volume: 59, página: 657-662, 2004.

RADI, P. A. ; TERRONES, M. G. H. Isolamento e identificação de produtos naturais obtidos de plantas com potencial atividade herbicida. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. volume: 70, página 10- 20, 2000.

RANG, H. P. ; DALE, M. M. ; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4 edição. Editora Guanabara Koogan S.A., 2007.

RESENDE, M. A. ; GONÇALVES, H. H. ; SABINO, G. S. ; PEREIRA, L.S.M. ; FRANCISCHI, J. N. Redução do efeito analgésico da estimulação elétrica nervosa transcutânea de baixa frequência em ratos tolerantes a morfina. **Revista Brasileira Fisioterapia**. volume: 10, página: 291-296, 2006.

RIBEIRO M. A. ; BERNADO-GIL. ; M. G. ; ESQUIVEI , M. M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercriticalfluid**. volume: 21, página: 51-60, 2001.

RIOS, J. L. ; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**. volume: 100, página: 80-84, 2005.

ROCHA, A. P. C. ; KRAYCHETE, D. C. ; LEMONICA, L. ; CARVALHO, L. R. ; BARROS, G. A .M. ; GARCIA, J .B. S. ; SAKATA, R .K. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Volume:57, página: 94-105, 2007.

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

ROSSATO, S. B. ; DRESCH, M. T. K. ; KAPPEL, V. D. ; BIEGELMEYER, R. ; HOFF, M. L. M. ; MAYORGA, P. ; ZUANAZZ, J. A. S. ; HENRIQUES, A. T. ; MOREIRA, J. S. F. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**. volume: 385, página: 107–114, 2009.

SALVEMINI, D. ; DOYLE, T. M ; CUZZOCREA, S. Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. **Biochemical Society Transactions**. volume: 34, página: :965-970, 2006.

SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos.** Araraquara. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SANNOMIYA, M. ; RODRIGUES, M. C. ; COELHO, R. G. ; SANTOS, L. C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. ; BRITO, A. R. M. S. ; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoides from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal Chromatography.** volume: 96, página:47-51, 2004.

SANNOMIYA, M. ; FONSECA, V. B. ; SILVA, M. A. ; ROCHA, L. R. M. ; SANTOS, L. C. ; HIRUMA-LIMA, C. A. ; BRITO, A. R. M. S. ; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacol.** Volume: 97, página: 1-6, 2005.

SARDI, J. C. O. **Isolamento e identificação de Bactérias patogênicas de biofilmes bucais de pacientes hospitalizados.** Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SARTORATTO, A. ; MACHADO, A. L. M. ; DELARMELINA, C. ; FIGUEIRA, G. M. ; DUARTE, M. C. T. ; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology.** volume: 35, página: 273- 280, 2004.

SCHMITT, A. C. ; ALMEIDA, A B. P. F. ; SILVEIRA, T. A. ; IWAKURA, C. T. ; MENDES, K. F. ; SILVA, M. C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz ("Folha-da-fortuna") colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae.** volume: 31, página: 55-58, 2003.

SEDGWICK, A. D. ; WILLOUGHBY, D. A. Animal models for testing drugs on inflammatory reactions. In: **Textbook of Immunopharmacology.** volume: 99, página: 253-261, 1989.

SERPELONI, J. M. ; VILEGAS, W ; VARANDA, E. A ; CÓLUS, I. M. S . Avaliação in vivo da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste do micronúcleo. *Semina. Ciências Biológicas/Saúde*, volume: 29, página: 47-56, 2008.

SHIRKE, S. S ; JAGTAP, A. G. ; PHADKE, A. S. Effect of polyherbal formulation on experimental models of inflammatory bowel diseases. **Journal of Ethnopharmacology**. volume: 90, página: 195–204, 2004.

SILVA, M. G. ; OLIVEIRA, F. S. ; OLIVEIRA, M. L. T. ; DINIZ, M. F. F. M. ; QUINTANS-Jr, L. J. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. volume: 24, página : 533-537, 2005.

SIMÕES, C. M. O. ; SCHENKEL, E. P. ; GOSMANN, G. ; MELLO, J. C. P. ; MENTZ, L. A. ; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao medicamento**. 6 edição. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul(UFRGS), 2007.

SOUZA, M. M. ; BELLA CRUZ, A. ; SCHUMACHER, M. B. ; KRUEGER, M. R. O. ; FREITAS, R. A. ; BELLA CRUZ, R. C. Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. IN: BRESOLIN, T. M. B. ; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaú: Ed.Univali, volume: 90, página: 239, 2003.

SOUZA, A. C ; ALIVIANO, D. S. ; BLANK, A. F. ; ALVES, P. B. ; ALIVIANO, C. S. ; GATTASS, C. R. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy Pharmacology**. volume: 56, página: 677-681, 2004.

SOUZA, C. M. M. ; SILVA, H. R. ; VIEIRA-Jr, G. M. ; AYRES, M. C. C. ; COSTA, C.L.S. ; ARAÚJO, D. S. ; CAVALCANTE, L. C. D. ; BARROS, E. D. S. ; ARAÚJO, P. B. M. ; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. volume: 30, página: 351-355, 2007.

SUFFREDINI, I. B. ; SADER, H. S. ; GONÇALVES, A. G. ; REIS, A. O. ; GALES, A. C. ; VARELLA, A. D. ; YOUNES, R. N. Screening of Antibacterial Extracts from Plants Native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**. Volume: 37, página: 379-384, 2004.

TANG, S.Y.; WHITEMAN, M.; PENG, Z.F.; JENNER, A.; YONG, E.L.; HALLIWELL, B. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicines. **Free radical biology and medicine**. volume: 3, página: 33-37, 2004.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 2ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.

TJOLSEN, A. ; BERGE, O. G. ; HUNSKAAR, S. ; ROSLAND, J. H. ; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. volume: 51, página: 5-17, 1997.

TOWETT, P. K ; KANUI, T. I ; JUMA F. D. Stimulation of mu and delta opioid receptors induces hyperalgesia while stimulation of kappa receptors induces antinociception in the hot plate test in the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). **Brain Research Bulletin**. volume: 71, página: 60–68, 2006.

TUROLLA, M. S. R. ; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. volume: 42, página: 56-63 , 2006.

VALGAS, C. ; SOUZA, S. M. ; SMANIA, E. F. A. ; SMANIA JUNIOR, A. . Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. volume: 38, página: 370-380, 2007.

VEIGA JR, V. F. ; PINTO, A. C. ; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. volume: 28, página: 519-528, 2005.

VIEGAS JR, C. ; VANDERLAN, S. B. ; JULIO, M. F. ; ELIEZER, J. B. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. volume: 29, página: 326-337, 2006.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**. volume: 3, página : 232-238, 1998

VITTA, F. A. ; PRATA, A. P. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Cyperaceae. **Boletim do Instituto de Botânica**. volume: 27, página: 43-62, 2009.

WEFFORT-SANTOS, A. M. ; PRESIBELLA, M. M ; SANTOS, C. A. M. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognesia**. volume: 13, página: 65-72, 2003.

WOOLF, C. J. Pain. **Neurobiology of Disease**. volume: 7, página: 504-510, 2000.

WOOLFE, G. ; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pentidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. volume: 80, página: 300- 347,1944.

XU, J. Z. ; YEUNG, S. Y. V. ; CHANG, Q. ; HUANG, Y. ; CHEN,Z. Y. Comparison of antioxidant activity and bioavailability of tea epicatechins with their epimers. **British Journal of Nutrition, Cambridge**. volume: 91, página: .873-881, 2008.

YUNES, R. A. ; CALIXTO, J. B. *Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*. 1 edição. SC: ARGOS editora universitária, 2001.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of leukocyte biology**. volume: 81, página: 584-592, 2007.