



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

CLIOMAR ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA
ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**

Aracaju, 2010

CLIOMAR ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA
ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**

*Dissertação de mestrado apresentada ao Núcleo
de Pós-Graduação em Medicina da Universidade
Federal de Sergipe para a obtenção do título de
Mestre.*

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

Aracaju, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237e Santos, Cliomar Alves dos
Estudo farmacológico do extrato etanólico da entrecasca da
Caesalpinia pyramidalis Tul.(Leguminosae) / Cliomar Alves dos
Santos. – São Cristóvão, 2010.
83f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Núcleo de
Pós-Graduação em Medicina, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e
Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

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

1. Antiinflamatório. 2. Antinociceptivo. 3. Plantas – Ação
terapêutica. 4. Antioxidante. I. Título.

CDU 615.2

CLIOMAR ALVES DOS SANTOS

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO DA
ENTRECASCA DA *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Leguminosae)**

*Dissertação de mestrado apresentada ao Núcleo
de Pós-Graduação em Medicina da Universidade
Federal de Sergipe para a obtenção do título de
Mestre.*

Aprovada em 10/09/2010

Orientadora: Sara Maria Thomazzi

1º Examinador: Prof. Dr. Emiliano de Oliveira Barreto

2º Examinador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

PARECER

DEDICATÓRIA

*A Deus, por me dar saúde e paz de espírito
para chegar até aqui e forças para continuar.*

*À minha família, pelo esforço para contribuir na minha formação,
especialmente aos meus pais que se empenharam tanto
para me proporcionar sempre o melhor.*

*À minha esposa, Danielle, por todo o apoio, carinho,
força, cumplicidade e conhecimento compartilhado comigo
estando presente em todos os momentos e experiências,
pelo incentivo e pelo amor.*

AGRADECIMENTOS

À professora Sara Thomazzi, primeiramente pela confiança depositada em mim, pela magistral orientação, pela oportunidade e pela paciência.

Aos professores Emilton Camargo e Dayseanne Falcão, pela amizade, pelas boas conversas, idéias e conselhos.

À minha família, com todo carinho aos meus irmãos, Claudimar e Cammila, tios, tias e primos por todo incentivo, amor e apoio.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre se dispuseram a ajudar e a manter o laboratório sempre organizado, especialmente a Cássia e a Ailane, pela proveitável iniciação científica.

Aos amigos que fiz na UFS, pelos bons momentos, boas conversas, idéias, especialmente a João Paulo, Daíseane, Wedmi, Ricardo, Janaína, Dennysson, Jandson, Renata, Aline e Izabel.

Ao núcleo de pós graduação em Ciências da Saúde, pela atenção dispensada aos alunos, à Martha e Jolinda.

Aos amigos que ganhei na turma do mestrado, pelo conhecimento, bons momentos e boas risadas compartilhados, especialmente a Wesley, Alípio, Diego, Tharciano, Mirabeau, Aida, Luana e Lyvia.

Aos técnicos do Departamento de Fisiologia da UFS, Dona Jane e Sr. Owaldo, por estarem sempre prontos e com toda disponibilidade a ajudar.

À UFS, pela disponibilização de seu espaço para desenvolvimento da pesquisa e por manter condições básicas para sua realização.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos animais, que mesmo involuntariamente, contribuíram com suas vidas para a ciência.

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,

Nunca tem medo e nunca se arrepende."

Leonardo da Vinci

RESUMO

A inflamação é um importante componente de muitas doenças cujo processo central é o recrutamento de células fagocitárias provocando dano tecidual. As plantas com uso terapêutico pela população são alternativas para o tratamento de doenças inflamatórias, dentre elas está a *Caesalpinia pyramidalis*, conhecida popularmente como “catingueira”, a qual foi objeto deste estudo, que buscou investigar as propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do extrato etanólico da entrecasca (EEE) desta planta da região semiárida nordestina. A prospecção fitoquímica preliminar do EEE revelou as classes de metabólitos secundários presentes: fenóis, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos e saponinas. Os animais foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) ou com o veículo (tween 80 a 0,2% em salina, 10 mL/kg, v.o.) 1 h antes. Grupos separados de animais foram pré-tratados 1 h antes com ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg, v.o., testes de contorções abdominais, formalina e edema de pata), dexametasona (2 mg/kg, s.c., modelos de peritonite e edema de pata) ou naloxona (5 mg/kg, i.p., teste da placa quente), e 30 min antes com morfina (3 ou 10 mg/kg, i.p., testes da placa quente e formalina) ou diazepam (1,5 mg/kg, i.p., teste de *rota rod*) os quais foram utilizados como controles padrão. Para avaliar a atividade antinociceptiva foram utilizados os modelos de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético a 0,6% (0,1 mL, i.p.), formalina (2%, 20 µL/pata) ou placa quente em camundongos (Swiss, n=6/grupo). O EEE nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu de forma significativa ($P < 0,001$) as contorções abdominais em 20,9, 41,7 e 69,5%, respectivamente, quando comparadas ao controle ($31,17 \pm 0,95$ contorções abdominais). O EEE nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg inibiu de forma significativa o tempo de lambida/mordida da pata dos camundongos em ambas as fases do teste de formalina ($P < 0,05$) e aumentou o tempo de latência dos animais na placa quente nos tempos registrados ($P < 0,05$). A naloxona foi capaz de reverter a inibição evocada pelo EEE (400 mg/kg) no modelo de placa quente, bem como o efeito da morfina. A fim de excluir uma possível intervenção do extrato na atividade motora foi realizado o teste da rota-rod no qual os resultados não mostraram diferença estatística com o grupo que recebeu o veículo. Para avaliar a atividade anti-inflamatória, foram utilizados os modelos *in vivo* de edema de pata e peritonite. No modelo de edema de pata induzido pela carragenina a 1% (100 µL/pata, s.c.) em ratos (Wistar, n=6/grupo), o EEE da *C. pyramidalis* na dose de 400 mg/kg causou inibição de 41,2% na formação do edema ($P < 0,05$). O recrutamento de neutrófilos para a pata

edemaciada foi medido indiretamente pela determinação da atividade da MPO. O tratamento oral dos animais com o EEE de *C. pyramidalis* (400 mg/kg) foi capaz de reduzir em 37,1% a atividade da MPO quando comparado ao controle ($7,12 \pm 0,94$ UMPO/mg de tecido, $P < 0,05$). No modelo de peritonite em camundongos (Swiss, $n=6$ /grupo), 4 h após a injeção de carragenina (1%, 0,25 mL, i.p.), observou-se que o EEE inibiu ($P < 0,01$) a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em 58,6% na dose de 400 mg/kg, quando comparado ao controle ($7,22 \pm 0,99 \times 10^6$ leucócitos/mL). A contagem diferencial dos leucócitos demonstrou diminuição ($P < 0,001$) dos polimorfonucleares para o sítio inflamatório nas doses de 200 e 400 mg/kg. O teste antioxidante realizado foi a peroxidação lipídica pelas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) onde um sistema *in vitro* de produção de radicais (AAPH-2,2-azobis-2-metilpropionamida) avaliou a capacidade do EEE (1 - 1000 µg/mL) em modular o dano oxidativo em uma preparação de lipossomos, utilizando a vitamina C (1,76 µg/mL) como controle. As concentrações de 100 e 1000 µg/mL do EEE da *C. pyramidalis* mostraram atividade antioxidante reduzindo ($P < 0,01$) a produção de TBARS, o que reforça a relação anti-inflamatória com os compostos antioxidantes. Concluímos que a planta *Caesalpinia pyramidalis* possui atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, embasando o uso popular como agente anti-inflamatório. Estas alterações biológicas devem estar relacionadas, ao menos em parte, à presença de taninos, flavonóides e saponinas.

Palavras-chave: anti-inflamatório; antinociceptivo; antioxidante; *Caesalpinia pyramidalis*; Leguminosae.

ABSTRACT

Inflammation is an important component of many diseases whose core process is the phagocytic cell recruitment causing tissue damage. Plants with therapeutic use by the population are alternatives for the treatment of inflammatory diseases, among them *Caesalpinia pyramidalis* is popularly known as "catingueira", and the objective of this study is to investigate the anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the ethanol bark extract (EBE) of this semi-arid Northeast plant. The preliminary phytochemical screening of the EBE revealed the presence of the following classes of secondary metabolites: phenols, tannins, flavonoids, steroids, triterpenes, and saponins. Animals were pretreated with the EBE of *C. pyramidalis* (100, 200, and 400 mg/kg, p.o.) or vehicle (0.2% tween 80 in saline, 10 mL/kg, p.o.) 1 h before. Separate groups of animals were pretreated 1 h before with acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg, p.o., for writhing, formalin and paw edema tests), dexamethasone (2 mg/kg, s.c., for model of peritonitis and paw edema) or naloxone (5 mg/kg, i.p., for hot plate test) and 30 min before with morphine (3 or 10 mg/kg, i.p., for hot plate test and formalin test) or diazepam (1.5 mg/kg, i.p., for *rota rod* test) which were used as standard controls. To assess the antinociceptive activity we have used the acetic acid-induced writhing (0.6%, 0.1 mL/10g, i.p.), formalin (2%, 20 μ L/paw) or hot plate models in Swiss mice (n = 6/group). The EBE, at the doses of 100, 200, and 400 mg/kg, significantly reduced ($P < 0.001$) the abdominal writhing in 20.9, 41.7, and 69.5%, respectively, as compared to control (31.17 ± 0.95 writhes). The extract at the doses of 100, 200 and 400 mg/kg decreases significantly the time that animals spent licking/biting their paw during both phases of the formalin test ($P < 0.05$) and increased the latency of animals in the hot plate test in recorded times ($P < 0.05$), as well as morphine effect. Naloxone was capable of reversing the inhibition evoked by the EBE (400 mg/kg) on the hot plate model, as well as the morphine effect. In order to exclude a possible involvement in motor activity of the extract was performed to *rota-rod* test in which the results showed no statistical difference with the group that received vehicle. To evaluate the anti-inflammatory activity were used *in vivo* models of paw edema and peritonitis. In the paw edema model induced by 1% carrageenan (100 μ L/paw, s.c.) in Wistar rats (n = 6/group), the EBE of *C. pyramidalis* at the dose of 400 mg/kg caused inhibition of 41.2% in the edema formation ($P < 0.05$). The recruitment of neutrophils to the swollen paw was indirectly measured by determining the MPO activity. Oral treatment of the animals with the EBE of *C. pyramidalis* (400 mg/kg) was able to reduce in 37.1% MPO

activity when compared with control ($7,12 \pm 0,94$ UMPO/mg tissue, $P < 0.05$). In the peritonitis model in *Swiss* mice ($n = 6/\text{group}$), 4 h after injection of carrageenan (1%, 0.25 mL, i.p.), was observed that the EBE inhibited ($P < 0.01$) the leukocyte migration into the peritoneal cavity in 58,6% at the dose of 400 mg/kg, as compared to control ($7,22 \pm 0,99 \times 10^6$ leukocytes/mL). The differential count of leukocytes confirmed the decrease ($P < 0.001$) of the polymorphonuclear cells to the inflammatory site at the doses of 200 and 400 mg/kg. The antioxidant test used was the lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive species (TBARS) where an *in vitro* system of radical production (AAPH-2,2-azobis-2-metilpropionamidina) evaluated the EBE ability (1 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) to modulate oxidative damage in a preparation of liposomes, using vitamin C (1.76 $\mu\text{g/mL}$) as control. The concentrations of the 100 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ of the EBE of *C. pyramidalis* reduced ($P < 0.01$) TBARS production, which strengthens the relationship between anti-inflammatory activity and antioxidant compounds. Concludes that the plant *Caesalpinia pyramidalis* has anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities, supporting the use in popular medicine as anti-inflammatory agent. These biological activities may be related, at least in part, to the presence of tannins, flavonoids, and saponins.

Key-words: anti-inflammatory; antinociceptive; antioxidant; *Caesalpinia pyramidalis*; *Leguminosae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de geração de espécies reativas do oxigênio pela adição de elétrons pela citocromo oxidase.....	27
Figura 2: Curva tempo-resposta (A) e gráfico da área sob a curva (B) do edema de pata induzido por carragenina em ratos	41
Figura 3: Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase em patas de ratos.....	42
Figura 4: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> sobre a migração de leucócitos induzida pela carragenina para a cavidade peritoneal em camundongos após 4h	43
Figura 5: Contorções abdominais induzidas por ácido acético.	44
Figura 6: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> no teste da formalina.	45
Figura 7: Efeito do EEE da <i>C. pyramidalis</i> no teste da coordenação motora.	47
Figura 8: Inibição da peroxidação lipídica provocada pelo ácido tiobarbitúrico.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Detecção colorimétrica para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	31
Tabela 2: Detecção colorimétrica de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	31
Tabela 3: Prospecção fitoquímica preliminar do EEE da <i>C. pyramidalis</i>	39
Tabela 4: Efeito antinociceptivo do EEE da <i>C. pyramidalis</i> no teste da placa quente.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
8R,15S-DIHETE	ácido di-hidroxi-icosatetranóico
AAPH	2,2-azobis-2-metilpropionamida
AAS	ácido acetilsalicílico
ASC	área sob a curva
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	ciclo-oxigenase
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EEE	extrato etanólico da entrecasca
ERN	espécies reativas de nitrogênio
ERO	espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	fator estimulador de granulócitos e macrófagos
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
HTAB	brometo de hexadeciltrimetilamônio
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
IFN-γ	interferon gama
IL	interleucina
i.p.	intraperitoneal
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MDA	malondialdeído
MPO	mieloperoxidase
NGF	fator de crescimento do nervo
NK-1	neurocinina-1
NKA	neurocinina A
NKB	neurocinina B
NO	óxido nítrico

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	fator de agregação plaquetária
PG	prostaglandina(s)
PGI₂	prostaciclina
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
PLA₂	fosfolipase A ₂
PMN	polimorfonucleares
SBCAL	Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório
s.c.	subcutânea
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
SP	substância P
s.pl.	subplantar
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
TNF-α	fator de necrose tumoral - α
UMPO	unidades de mieloperoxidase
v.o.	via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos.....	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1. Inflamação.....	22
3.1.1. Mediadores da inflamação	22
3.1.2. Dor: considerações gerais	24
3.2. Radicais livres e antioxidantes	26
3.3. Gênero <i>Caesalpinia</i>	28
3.3.1. <i>Caesalpinia pyramidalis</i>	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1. Planta (coleta e identificação)	30
4.2. Preparação do extrato etanólico	30
4.3. Prospeção fitoquímica	30
4.3.1. Teste para fenóis e taninos.....	30
4.3.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides	31
4.3.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas	31
4.3.4. Teste para flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas.....	32
4.3.5. Teste para esteróides e triterpenóides (Liebermann-Buchard)	32
4.3.6. Teste para saponinas	32
4.4. Animais	32
4.5. Tratamentos.....	33
4.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória	33
4.6.1. Edema de pata em ratos	34
4.6.2. Ensaio de mieloperoxidase (MPO) nas patas de ratos	34
4.6.3. Peritonite em camundongos.....	35
4.7. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	35
4.7.1. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	35
4.7.2. Teste da formalina	36
4.7.3. Teste da placa quente	36

4.8. Avaliação da atividade motora.....	37
4.8.1. Teste da barra giratória <i>rota-rod</i>	37
4.9. Avaliação da atividade antioxidante	37
4.9.1. Peroxidação lipídica <i>in vitro</i>	37
4.10. Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Prospeção fitoquímica	39
5.2. Edema de pata	40
5.3. Ensaio da atividade da mieloperoxidase nas patas de ratos	42
5.4. Peritonite e contagens total e diferencial de leucócitos do lavado peritoneal	42
5.5. Contorções abdominais	44
5.6. Teste da formalina	44
5.7. Teste da placa quente	45
5.8. Teste da barra giratória <i>rota-rod</i>	47
5.9. Peroxidação lipídica – TBARS	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO I.....	71
ANEXO II	72

1. INTRODUÇÃO

Durante a evolução da humanidade, as populações vêm construindo e transformando os conhecimentos relacionados à natureza e os incorporando aos seus modos de vida. Conhecer esses “saberes” tradicionais é necessário para conservação da biodiversidade, pois permite identificar melhor o uso das espécies nativas e as pressões a que elas estão submetidas. As plantas medicinais têm sido usadas em países em desenvolvimento como uma alternativa no tratamento de doenças. Muitos extratos e óleos essenciais isolados de plantas apresentam atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, o que justifica pesquisas baseadas no conhecimento da medicina popular (MARTÍNEZ et al., 1996; QUEIROZ et al., 2010).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam práticas medicinais tradicionais, sendo que 85% dessas práticas envolvem plantas medicinais (ALMEIDA et al., 2006). O conhecimento do uso terapêutico dos recursos naturais pelo homem, ao longo dos tempos, possivelmente garantiu sua sobrevivência e foi objeto de especial cuidado por parte das populações tradicionais. No semi-árido, até hoje, a pecuária extensiva e a coleta de produtos florestais mantêm-se incorporadas ao cotidiano das populações, permitindo que os produtos usados sejam obtidos diretamente da natureza e as experiências transmitidas para as novas gerações.

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 56.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GIULIETTI et al., 2005). Destas, apenas 8% foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996), com 512 plantas registradas para comercialização no Ministério da Saúde (CARVALHO et al., 2008).

O nordeste brasileiro, bem como o estado de Sergipe, onde prevalece o clima marcado por secas periódicas e precipitação que varia entre 300-800 mm/ano, é caracterizado pela diversidade de formas vegetais. Nesta região, existe um predomínio de caatingas, associadas a carrascos e mata de altitude (matas de brejo), além de áreas de cerrado e de campo rupestre, mata atlântica e vegetação costeira, entre outras. Este cenário ocupa 18% do território nacional (1.561.177,8 km²), onde vivem 51 milhões de habitantes (OLIVEIRA, 1995; BRASIL, 2009), sendo que a população da região representa 45% da população rural do Brasil (ALBUQUERQUE, 2006).

A palavra caatinga vem do tupi que significa “floresta branca” ou “floresta limpa”; sua vegetação está situada em regiões que possuem temperatura média anual de 25°C e 599 mm de chuva distribuída irregularmente ao longo do ano, onde predominam as xerófitas e as espécies decíduas (ALBUQUERQUE, 2006).

A utilização de plantas medicinais constitui-se, muitas vezes, no único tratamento terapêutico possível, principalmente devido ao difícil acesso a medicamentos alopáticos, ao alto custo destes, ao acesso à assistência médica, justificando-se com isso a disseminação do uso de preparações com plantas (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008). No entanto, frequentemente, essa prática é realizada sem critérios, o que pode se tornar perigoso, pois de acordo com Matos (1997b), as mesmas plantas que curam podem também matar, sendo necessária, portanto, a realização de estudos sistemáticos.

O uso abusivo e incorreto de fármacos sintéticos, os quais podem gerar sérios efeitos colaterais e as dificuldades de acesso aos tratamentos convencionais, estão entre as principais razões de interesse no conhecimento das plantas medicinais. Estas plantas e os fitoterápicos são medicamentos largamente utilizados pela população constituindo-se um mercado em potencial expansão, entretanto, pouco conhecimento científico existe acerca das plantas de uso terapêutico (CARVALHO et al., 2008).

Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, poucos estudos são realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança. Desta forma, a maioria dos fitoterápicos fabricados pela indústria brasileira está fundamentada somente no uso popular das plantas sem nenhuma, ou com pouca comprovação pré-clínica ou clínica, não podendo, portanto, ser competitivo em nível nacional e muito menos internacional (YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).

As plantas medicinais que têm sua eficácia terapêutica e toxicológica ou segurança de uso avaliadas, dentre outros aspectos, estão cientificamente aprovadas para serem utilizadas pela população nas suas necessidades básicas de saúde, além de possuírem outras vantagens como facilidade de acesso, baixo custo e compatibilidade cultural com as tradições populares (GAZZANEIO; LUCENA; ALBUQUERQUE, 2005).

A espécie arbórea *Caesalpinia pyramidalis* Tul., pertencente à família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae, conhecida popularmente como “catingueira” (ALVES et al., 2007), é característica da caatinga, vegetando em lugares pedregosos (SILVA; MATOS, 1998). Suas flores, folhas e cascas são usadas em infecções catarrais e diarreicas (MONTEIRO et al., 2005) e como agentes anti-inflamatórios (BAHIA et al., 2005), possuindo bom potencial antioxidante (ALVIANO et al., 2008). A entrecasca da “catingueira”

é usada como afrodisíaco, contra disenterias, diarreias e como expectorante, usado na bronquite, tosse e infecções respiratórias (AGRA et al., 2007).

Muitos extratos de plantas do gênero *Caesalpinia* possuem atividade anti-inflamatória em estudos com animais. A *C. pulcherrima* e a *C. bonducella* possuem importância na medicina popular devido às suas propriedades anti-inflamatórias (ARCHANA et al., 2005; RAO; FANG; TZENG, 2005). A *C. cheilanta* é usada contra dores de cabeça e expectorante, a *C. ferrea* contra doenças renais e no labirinto (ALBUQUERQUE, 2006), e a *C. sappan* é utilizada devido suas propriedades antioxidantes (BADAMI et al., 2003).

O processo inflamatório é um importante componente de muitas doenças. O evento central é o recrutamento de células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) (BABIOR, 1978). Quando estas células são recrutadas em grande número para um espaço restrito, este se torna um local propício para danos ao tecido (HALLIWELL; HOULT; BLAKE, 1988; WEISS, 1989). A inibição da biossíntese de prostaglandinas e da produção de óxido nítrico é considerada importante na diminuição do processo inflamatório e como agente preventivo contra o câncer (HONG et al., 2002).

Atualmente, a pesquisa nesta área está voltada à procura de substâncias com atividades biológicas, no sentido de dar uma base científica ao conhecimento popular ou para a obtenção de novas estruturas químicas de interesse à indústria farmacêutica. Em consequência disso, este trabalho avaliou a atividade anti-inflamatória da *Caesalpinia pyramidalis*, usada popularmente para tratar doenças inflamatórias (BAHIA et al., 2005), além das atividades antinociceptiva e antioxidante desta planta.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar ações farmacológicas do extrato etanólico da entrecasca (EEE) da *Caesalpinia pyramidalis*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Realizar a prospecção fitoquímica do EEE da planta.
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória do EEE da *C. pyramidalis* em modelos *in vivo*.
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva do EEE da *C. pyramidalis* em modelos *in vivo*.

- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do EEE da *C. pyramidalis* em teste *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Inflamação

Processos inflamatórios são complexos fenômenos bioquímicos e celulares que se manifestam fisiologicamente nos tecidos por dor, edema e infiltração leucocitária (MORENO, 1997), envolvendo eventos como aumento da permeabilidade vascular e da migração de células mononucleares e granulócitos para o tecido inflamado (ANDRADE et al., 2007).

Os processos inflamatórios podem ser desencadeados por vários estímulos, dentre eles infecções por micro-organismos, trauma, agentes físicos e químicos, necrose tissular, corpos estranhos e reações imunológicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; WEISS, 2008). A inflamação aguda é caracterizada por exsudação de fluido e proteínas plasmáticas no local da formação do edema, consistindo em componentes leucócitos-dependentes e leucócitos-independentes (LAZZARINI et al., 2006).

Inflamação excessiva ou inapropriada é a causa de inúmeras doenças incluindo artrite reumatóide, psoríase e doenças inflamatórias intestinais, além disso, é o principal dano causado por doenças autoimunes e contribuem na evolução de doenças como câncer, diabetes e cardiovasculares (LUCAS; ROTHWELL; GIBSON, 2006).

3.1.1. Mediadores da inflamação

Originados a partir de proteínas plasmáticas ou de células, os mediadores da inflamação são substâncias cuja produção é desencadeada por produtos microbianos ou proteínas do hospedeiro, tais como sistemas do complemento e cininas, que são ativados, por sua vez, por microorganismos e tecidos danificados; podem desempenhar papel de receptores de células-alvo, enzimático ou oxidativo, estimulando a liberação de outros mediadores. A maioria dos mediadores tem o potencial de causar efeitos danosos ao organismo humano (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Muitos desses mediadores são desenvolvidos localmente e, em certas terapêuticas, são os principais alvos (MEDZHITOV, 2008).

As prostaglandinas (PG) são metabólitos do ácido araquidônico que são sintetizadas e liberadas por muitos tipos de células e formadas pela ação da enzima ciclo-oxigenase (COX) na primeira etapa da sua biossíntese pela adição de duas moléculas de oxigênio (GIERSE et

al., 2008). Esta enzima possui duas isoformas, a COX-1 e a COX-2 (HONG et al., 2002; KIM et al., 2004).

A COX induzível (COX-2) é aumentada em resposta a vários estímulos, incluindo os inflamatórios em diferentes tipos de tecidos, largamente expressa em macrófagos e mastócitos quando estimulados por citocinas pró-inflamatórias ou por lipopolissacarídeo, enquanto que a COX constitutiva (COX-1), atua na manutenção da função celular e está presente em todo tipo de célula (ANDRADE et al., 2007). Uma variante da enzima COX-1, a COX-3, foi descrita no córtex cerebral e no coração (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Outra importante enzima que contribui para geração de mediadores inflamatórios é a 5-lipoxigenase, que catalisa a formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Os leucotrienos são sintetizados por leucócitos residentes ou recrutados durante processos inflamatórios. Estas moléculas agem via receptores de superfície de membrana acoplados a proteína G, desencadeando eventos sinalizadores intracelulares que levam ao acúmulo de leucócitos, aumento da capacidade fagocítica e microbicida pelos fagócitos e geração de outros mediadores pró-inflamatórios (PETERS-GOLDEN et al., 2005).

O fator de agregação plaquetária (PAF), um derivado lipídico da ação das fosfolipases (PLA₂), atua via receptores específicos de superfície celular, localizados em numerosas células e tecidos, incluindo plaquetas, leucócitos e células endoteliais (SCHOLMERICH, 1996). O PAF está envolvido em muitos eventos inflamatórios, incluindo aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos (FORMELA; GALLOWAY; KINGSNORTH, 1995).

Sugere-se que além dos derivados do ácido araquidônico, o óxido nítrico (NO) está envolvido no processo inflamatório. O NO é um importante mensageiro de vários sistemas no organismo participando, por exemplo, na regulação do tônus vascular, na defesa imunológica do hospedeiro promovendo a diminuição da migração de leucócitos para o local da inflamação, na neurotransmissão e em inúmeras funções endócrinas. Algumas disfunções vasculares estão associadas à produção prejudicada de NO. Entretanto, conforme sua concentração e o tecido em questão, o NO (tanto diretamente como por meio de espécies derivadas) pode atuar como agente citotóxico, com importante papel no processo inflamatório (BARRETO; CORREA; MUSCARÁ, 2005; SHUKLA et al., 2009).

Outro mediador é a histamina, que é uma amina básica relacionada com processos inflamatórios e alérgicos causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (ANDRADE et al., 2007). Neuropeptídeos, como a substância P (SP) e a neurocinina A (NKA), que são liberados a partir de terminações nervosas sensoriais, têm sido observados em

estudos estimulando a liberação de histamina pelos mastócitos a qual causa aumento da permeabilidade vascular, aumentando a síntese de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL) (GUO et al., 1997), e estimula as terminações nervosas sensoriais, fazendo com que seja liberada mais substância P. A neurocinina B (NKB) produz antinocicepção mediada por receptores opióides na medula espinhal e está correlacionada com a dor neuropática (CAHILL; CODERRE, 2002).

A SP é um neuropeptídeo pertencente à família das taquicinininas, sendo sintetizada e liberada de terminações nervosas sensoriais. Essa substância atua, preferencialmente, através de receptores de membranas de neurocinina-1 (NK1) nas células efetoras, aumentando a permeabilidade microvascular e promovendo extravasamento de proteínas plasmáticas do espaço intravascular para o espaço extravascular, com subsequente formação de edema (PATTO et al., 1992).

Os mediadores envolvidos na dor são PG, NKA, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), entre outros (ROCHA et al., 2008). As cininas (calidina e bradicinina) são importantes mediadores vasoativos derivados da ação de enzimas denominadas caliceínas (tecidual ou plasmática) sobre cininogênios de alto ou baixo peso molecular. Esses mediadores são, por sua vez, degradados pela ação de enzimas chamadas cininases I e II e estão envolvidas em vários processos inflamatórios, causando principalmente aumento da permeabilidade vascular e formação de edema. A bradicinina tem maior importância em processos inflamatórios, age preferencialmente via ativação de receptores acoplados à proteína G, denominados receptores B₂ quando ativados agudamente e, em condições crônicas, via receptores B₁ (LIEBMANN et al., 1990; MEINI et al., 2009).

Sendo a dor o principal sintoma da inflamação que faz com que o indivíduo doente procure ajuda médica, estando ou não associada a processos inflamatórios, a busca de novos agentes para seu tratamento, com menos reações adversas, é sempre necessária (ROCHA et al., 2008).

3.1.2. Dor: considerações gerais

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 2002), esta é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial e/ou de fato. Não obstante, é um processo cognitivo dependente da memória e de aspectos culturais e psíquicos.

A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório em que a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum, mostrando-se mais persistente durante a lesão tecidual e a inflamação (FERREIRA; LORENZETTI, 1995). Esta sensibilização causa hiperalgesia ou alodínia em humanos, fenômenos que envolvem a percepção da dor, e é mais bem descrita como hipernocicepção em modelos animais (VERRI-JUNIOR et al., 2006; CUNHA et al., 2008).

Os mediadores inflamatórios envolvidos com a dor são bradicinina, PGE_2 , prostaciclina (PGI_2), leucotrienos (LTB_4), ácido (8R,15S)-di-hidroxi-icosa-(5E-9,11,13Z) tetraenóico (8R,15S-diHETE), 5-hidroxitriptamina (5-HT), adenosina, histamina, IL-1, IL-8, fator de crescimento do nervo (NGF), $TNF-\alpha$, mediadores derivados de fibras sensoriais, como a SP (LEVINE; REICHLING, 1999), K^+ , H^+ , ATP, NO, neurotrofinas, neuropeptídeos (NKA, CGRP) e mediadores simpáticos, os quais podem agir de modo sinérgico (KIDD; URBAN, 2001).

A maioria destes mediadores age através da ativação de receptores acoplados à proteína G, fosforilando canais iônicos, via ativação das proteínas quinases A (PKA) e C (PKC). Podem atuar ativando diretamente o nociceptor (histamina e SP) induzindo dor espontânea ou sensibilizando os nociceptores induzindo hiperalgesia (citocinas, 5-HT e PGE_2) (RIEDEL; NEECK, 2001). A bradicinina pode ativar direta ou indiretamente os nociceptores, acarretando dor e/ou ainda sensibilização periférica a qual envolve a liberação de outros mediadores como as aminas biogênicas, neuropeptídeos e a geração de ácido araquidônico e prostanóides (DRAY; PERKINS, 1993).

Uma variedade de citocinas está envolvida na dor induzida por inflamação e dor neuropática mediada pela medula. Os mecanismos envolvidos incluem a liberação de eicosanóides de vários tecidos, o aumento da expressão de receptores para NGF e cininas ou ativação de fibras simpáticas (ARRUDA et al., 2000; MILLIGAN et al., 2001). Além disso, tem sido proposto que TNF e $IL-1\beta$ têm papel relevante para a indução e manutenção de estados hipernociceptivos por meio da regulação da síntese de $IL-6$ (SWEITZER; MARTIN; DELEO, 2001). É importante salientar que $IL-1\beta$ é capaz de aumentar a síntese de $COX-2$ no sistema nervoso central (SNC), contribuindo para fenômenos hipernociceptivos (SAMAD et al., 2001).

As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são caracterizadas como fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, denominadas fibras C e $A\delta$. As fibras C não são mielinizadas, possuem baixa velocidade de condução (<1 m/s) e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras $A\delta$ são mielinizadas, apresentam

velocidade de condução de 5-30 m/s e respondem a estímulos térmicos e mecânicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

3.2. Radicais livres e antioxidantes

Radicaís livres podem ser definidos como quaisquer espécies químicas capazes de existirem independentes, contendo um ou mais elétrons em sua camada externa. Quimicamente, esta valência livre torna a molécula extremamente reativa e, fisicamente, este elétron desemparelhado torna a molécula paramagnética (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Esses radicaís livres que possuem o elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados, respectivamente, espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (HALLIWELL, 2001).

As EROs são representadas por radicaís como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e por outras espécies não radicalares, tais como, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso (HClO) (HALLIWELL, 2001). As ERNs são representadas pelo óxido nítrico ($ON\bullet$), um radical livre pouco reativo, que em concentrações iguais ou superiores a 1 μM inibe a enzima mitocondrial citocromo *c* oxidase, aumentando a formação de $O_2^{\bullet-}$ que reage com o próprio NO gerando peroxinitrito ($ONOO^-$), um radical altamente reativo e de elevado potencial danoso para biomoléculas, especialmente proteínas, através de modificações no aminoácido tirosina (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

A oxidação é essencial aos organismos vivos com fins de produção de energia para os processos biológicos, no entanto, a ação dos radicaís livres gerados neste processo resulta em morte celular e danos teciduais (SHUKLA et al., 2009). Efeitos tóxicos das espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídios, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (LIMA; ABDALLA, 2001).

As reações de oxidação celular ocorrem no citoplasma, na membrana e na mitocôndria, mas é nesta organela redox ativa, responsável pela produção de energia celular, onde ocorre a principal fonte de produção dessas espécies e, em decorrência disto, torna-se o principal alvo de danos causados pelos radicaís livres (BOVERIS; NAVARRO, 2008). Durante o metabolismo mitocondrial basal, essas espécies são constantemente neutralizadas pelas defesas antioxidantes. Contudo, em condições patológicas, os mecanismos antioxidantes

são incapazes de combater a excessiva formação de EROs e ERNs resultando em processos de inflamação e morte celular, tendo um papel significativo na indução do envelhecimento e na implicação de uma grande variedade de doenças humanas (MANDELKER, 2008), com grande ênfase para as crônicas (JUN et al., 2008).

Durante o processo de obtenção de energia, a enzima citocromo *c* oxidase adiciona quatro elétrons à molécula de oxigênio e a reduz a água, seguindo quatro passos sequenciais, nos quais libera sucessivas espécies reativas, tais como o $O_2^{\bullet-}$, o H_2O_2 e o $^{\bullet}OH$ (VALKO et al., 2007) (Figura 1).

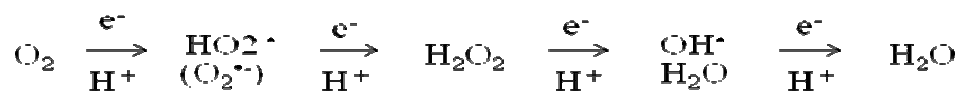


Figura 1: Reação de geração de espécies reativas do oxigênio pela adição de elétrons pela citocromo oxidase.

Entretanto, a mitocôndria possui um eficiente sistema de defesa antioxidante, que inclui superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase, glutathione redutase, glutathione reduzida (GSH), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatado [NAD(P)] transidrogenase e dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatado reduzida [NAD(P)H], além das vitaminas C e E (St-PIERRE et al., 2002).

A lipoperoxidação pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquila, alcoila e peroxila, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condições extremas, à morte celular (LIMA; ABDALLA, 2001; SRINIVASAN et al., 2007).

Basicamente, a peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico como produto primário inicial. Pode ocorrer por duas vias, a enzimática envolvendo as lipoxigenases e as ciclo-oxigenases na oxigenação dos ácidos graxos, e a não enzimática que envolve a participação das EROs e ERNs, metais de transição e outros radicais livres (PORTER; CALDWELL; MILLS, 1995).

Os antioxidantes são substâncias que, mesmo quando presentes em baixas concentrações comparadas com as substâncias pró-oxidantes, previnem a oxidação destas (ARUOMA, 2003), sendo necessários para a proteção do corpo contra danos induzidos pelo estresse oxidativo (SHUKLA et al., 2009). Do ponto de vista biológico, antioxidantes são

definidos como compostos que protegem os sistemas do organismo contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação e nitratação de macromoléculas ou estruturas celulares (MONTEIRO, 2006).

Os sistemas antioxidantes são representados por dois grupos distintos, os enzimáticos e os não-enzimáticos. O sistema enzimático é composto pelas enzimas SOD que se localiza no citosol e na mitocôndria e remove o radical superóxido, convertendo-o em peróxido de hidrogênio; a catalase (CAT), que se encontra predominantemente nos peroxissomos e catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio; e a glutathione peroxidase (GPx), encontrada no citosol, mitocôndrias e meio extracelular e que tem a função de converter o H_2O_2 em água e hidroperóxidos em álcoois estáveis (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os antioxidantes não-enzimáticos compreendem um grande número de compostos sintetizados pelo organismo tais como a glutathione, a bilirrubina, a ceruloplasmina, a melatonina, o ácido úrico ou aqueles ingeridos através da dieta regular como o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol, o selênio, o beta-caroteno e os flavonóides (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Quando o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e nitrosativas e os antioxidantes é positivo para as primeiras, o resultado é a indução de danos celulares pelos radicais livres levando ao estresse oxidativo e nitrosativo, e como consequências mais comuns a evolução para doenças agudas, crônicas e morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VALKO et al., 2007; PIENIZ et al., 2009).

A atividade antioxidante de compostos com este potencial, de uma maneira geral, apresenta uma correlação com suas propriedades anti-inflamatórias. As plantas mostram-se como uma fonte eficiente de produto antioxidante *in vivo* e *in vitro* dada à grande quantidade de metabólitos isolados de plantas com propriedades antioxidantes comprovadas (MEOTTI et al., 2006; WILLAIN-FILHO et al., 2008).

3.3. Gênero *Caesalpinia*

O gênero possui mais de 150 espécies nas áreas tropicais e subtropicais no mundo (BAHIA et al., 2005). A *Caesalpinia minax* é utilizada popularmente no tratamento da infecção pelo vírus da influenza, em disenterias e inflamação decorrente do reumatismo (CHENG et al., 2009). As análises fitoquímicas da *Caesalpinia bonducella* indicam que possui flavonóides, terpenóides, glicosídeos, saponinas, taninos e alcalóides, e testes

farmacológicos demonstraram atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, (ARCHANA et al., 2005). A *C. digyna* apresenta atividade antioxidante comprovada bioquimicamente em testes *in vitro* e *in vivo* (SRINIVASAN et al., 2007). A *C. cheilanta* é usada contra dores de cabeça e expectorante e a *C. ferrea* contra doenças renais e no labirinto (ALBUQUERQUE, 2006). A *Caesalpinia echinata* (“pau-brasil”) foi muito importante durante a colonização do Brasil (BAHIA, 2002). Os metabólitos secundários encontrados na maioria das espécies do gênero *Caesalpinia*, assim como da família Leguminosae, circundam em torno de flavonóides, esteróides, taninos e triterpenos (MENDES et al., 2000; ZAKARIA et al., 2007; JUN et al., 2008; CHENG et al., 2009).

3.3.1. *Caesalpinia pyramidalis*

Na caatinga, vegetação mais prevalente no nordeste brasileiro, onde prevalece a agricultura sazonal e as plantações como atividades econômicas, a população nativa é responsável tanto pelo desmatamento quanto pelo reflorestamento. Em pesquisa, a *C. pyramidalis* está entre as plantas mais utilizadas pela população de um modo geral (ALBUQUERQUE, 2006).

Do gênero *Caesalpinia*, família Leguminosae, a *C. pyramidalis* Tul. é uma árvore endêmica da região nordeste na vegetação da caatinga, no sertão, habitando lugares pedregosos. É conhecida como “catingueira”, “catingueira-das-folhas-largas”, “catinga de porco”, “pau-de-rato” e “massitaiba” (BRAGA, 1960; UMBUZEIRO, 2005). Esta planta é empregada popularmente como diurético, dispéptico, digestivo, antipirético, no tratamento de infecções catarrais e como agente anti-inflamatório (SILVA; MATOS, 1998; MENDES et al., 2000; BAHIA et al., 2005). Nos estudos de Alviano et al. (2008), a *C. pyramidalis* mostrou atividade antibacteriana extinguindo a flora de *Pseudomonas gengivalis* após 2,5 h de contato.

A partir da extração clorofórmica das folhas da *C. pyramidalis* foram obtidos caesalflavona, podocarpusflavona A, agatisflavona, apigenina, campferol, sitosterol e lupeol, e da extração do caule foram obtidos 4,4'-di-hidro-2'-metoxi-chalcona, (-)-siringaresinol e galato de metila (BAHIA et al., 2005). Outros estudos, como o de Mendes et al. (2000), mostraram a presença de ácido-4-o- β -glicopirosaniloxi-(z)-7-hidroxicinâmico, ácido-4-o- β -glicopirosaniloxi-(z)-8-hidroxicinâmico e lupeol na *Caesalpinia pyramidalis*. Alguns desses compostos possuem atividades anti-inflamatória e antioxidante conhecidas, por fazerem parte de classes de metabólitos secundários de plantas, como os polifenóis e os terpenóides.

4. METODOLOGIA

4.1. Planta (coleta e identificação)

A entrecasca do tronco da planta *C. pyramidalis* foi coletada no povoado Xingó, município de Canindé do São Francisco, estado de Sergipe (09°66'00" S, 37°78'94" O) em setembro de 2008. Um espécime foi identificado pela botânica professora Ana Paula Prata do Departamento de Biologia da UFS, e depositado no Herbário da Universidade Federal de Sergipe (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão - SE 49100-000, Brasil) sob o n° ASE 13.164. Antes da extração a entrecasca foi seca em estufa (Marconi MA 037) a 40°C, com renovação e circulação de ar, durante 48 h.

4.2. Preparação do extrato etanólico

A entrecasca seca (2840 g) da *C. pyramidalis* foi inicialmente moída até ser transformada em pó, e posteriormente submetida à extração com etanol 90% em percolador de aço inoxidável durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 45°C, com um rendimento de 2,62%, obteve-se o extrato etanólico bruto, que foi seco e submetido aos ensaios preliminares para avaliação de atividades farmacológicas.

4.3. Prospecção fitoquímica

O EEE da *C. pyramidalis* foi submetido à prospecção fitoquímica preliminar, seguindo a descrição qualitativa de Matos (1997a), sendo que a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa do outro. A amostra do EEE foi aliquoteada em sete porções iguais de 3 mL dissolvidos em etanol P.A. e os tubos de ensaio numerados de 1 a 7.

4.3.1. Teste para fenóis e taninos

No tubo de ensaio de número 1, foram adicionadas 150 µL de solução alcoólica contendo FeCl₃ 1 mol/L em HCl 60 mmol/L. A mistura foi submetida à agitação e observou-se quaisquer variação de cor e/ou formação de precipitado escuro abundante. O resultado foi comparado com um “teste branco”, contendo apenas água e FeCl₃.

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

4.3.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Os tubos numerados com 2, 3 e 4 foram utilizados neste teste, o conteúdo de tubo de ensaio de número 2 foi acidificado a pH 3 com HCl 3 mol/L, e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados a pH 8,5 e 11, respectivamente, com NaOH 1 mol/L. A observação de mudança de coloração nas soluções foram interpretadas conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Detecção colorimétrica para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Constituintes	Cor		
	Ácido pH=3	Alcalino pH=8,5	Alcalino pH=11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-	Vermelho Púrpuro
Flavononóis	-	-	Vermelho Laranja

4.3.3. Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Acidificou-se o tubo 5 por adição de HCl 3 mol/L até pH 2 e alcalinizou-se o tubo 6 com NaOH 1 mol/L até pH 11. Os tubos foram aquecidos em banho-maria até início da ebulição. A modificação na coloração foi observada por comparação com os tubos correspondentes utilizados no teste anterior. A interpretação dos resultados foi realizada tomando-se por base a tabela 2.

Tabela 2: Detecção colorimétrica de leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

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

4.3.4. Teste para flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas

No tubo de ensaio de número 7 foi adicionado 10 mg de Mg^{2+} granulado e 500 μL de HCl P.A. O término da reação foi indicado pelo fim da efervescência provocada pela liberação de H^+ da reação ($Mg + 2HCl \rightarrow 2H^+ + MgCl_2$). A interpretação dos resultados foi feita por comparação tendo como base a cor da solução do tubo 5 com o 7.

4.3.5. Teste para esteróides e triterpenóides (Liebermann-Buchard)

Foram adicionados 10 mL de uma solução etanólica do EEE em béqueres que foram aquecidos em banho-maria até evaporação do álcool. O resíduo seco do EEE foi extraído com 2 mL de $CHCl_3$ e separados em diferentes tubos de ensaio sendo posteriormente filtrado com Na_2SO_4 anidro para adsorção da água. Após isso, foi adicionado 1 mL de anidrido acético e logo após 150 μL de H_2SO_4 concentrado (reação de Liebermann-Burchard). O tubo foi agitado suavemente e foi observado o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida de verde permanente é um indicativo da presença de esteróides livres e a coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

4.3.6. Teste para saponinas

Os resíduos insolúveis da fração clorofórmica do teste anterior foram solubilizados em água destilada e filtrados. A solução foi submetida a uma forte agitação por 3 min e observou-se a formação de espuma. O aparecimento de espuma persistente e abundante (“colarinho”) indica a presença de saponinas.

Utilizando como teste confirmatório, 2 mL de HCl concentrado foram adicionados ao conteúdo do tubo deixando 1 h em banho-maria. Após neutralização, resfriamento e agitação, a presença de precipitado e a não formação de espuma confirmaram a presença de saponinas.

4.4. Animais

Os animais, ratos *Wistar* e camundongos *Swiss*, de ambos os sexos, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil) e trazidos para o biotério local do Departamento de Fisiologia antes do uso, onde permaneceram por pelo menos 02 dias até o manuseio. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos e mantidos em caixas plásticas (5 ratos ou 10 camundongos por caixa) em sala com temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ C$), com água e ração *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12:12 h, e troca

diária da serragem. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos durante o período das 7 às 17 h, e de acordo com as normas de procedimentos sobre cuidados com animais para uso em pesquisa do Comitê de Ética da Universidade Federal de Sergipe e da Sociedade Brasileira de Cuidados com Animais de Laboratório (SBCAL). Os animais submetidos à administração oral do EEE e dos controles foram aclimatados no laboratório 24 h e colocados em jejum 12 h antes do experimento. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o sofrimento destes, sendo administrado anestésico sempre que necessário. Posteriormente, após o manuseio dos animais nos procedimentos *in vivo*, estes foram anestesiados com uma dose de 50 mg/kg intraperitonealmente (i.p.) de tiopental sódico (Thiopentax – Cristália/SP) e eutanasiados por deslocamento da cervical, acondicionados em sacos plásticos brancos e guardados em freezer reservado para esta finalidade, até o descarte definitivo conforme a rotina do Departamento de Fisiologia, pelo serviço de coleta seletiva de lixo biológico da UFS. Para o desenvolvimento deste projeto, o mesmo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe e aprovado sob o protocolo n.º 05/09.

4.5. Tratamentos

Os animais foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* em diferentes doses (100, 200 e 400 mg/kg) ou com o veículo (Tween 80 a 0,2% em solução salina NaCl 0,9%, 10 mL/kg, controle negativo) por via oral (v.o.) 1 h antes da administração dos compostos indutores da inflamação ou nocicepção. Como controle positivo, grupos de animais foram tratados com ácido acetilsalicílico (Sigma Chem Co., EUA; AAS; 300 mg/kg, v.o., 60 min antes), dexametasona (Research Biochemicals International, EUA; 2 mg/kg, subcutânea (s.c.), 60 min antes), morfina (Cristália/SP; 3 ou 10 mg/kg, i.p., 30 min antes) ou diazepam (Cristália/SP, 1,5 mg/kg, i.p., 30 min antes), dependendo do teste. Em adição, grupos separados de animais foram inicialmente tratados com naloxona (Research Biochemicals International/EUA, 5 mg/kg, i.p., 60 min antes) e, posteriormente, com o EEE (400 mg/kg, v.o., 30 min antes) ou morfina (3 mg/kg, i.p., 30 min antes).

4.6. Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.6.1. Edema de pata em ratos

Um método utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória foi o modelo de edema de pata induzido pela carragenina a 1% (Sigma Chem Co., EUA), administrada no volume de 100 μ L/animal na região subplantar (s.pl.) da pata traseira direita do rato, segundo o método descrito por Winter, Risley e Nuss (1962) modificado. Os animais (ratos *Wistar*, 120-180 g, n = 6/grupo) foram pré-tratados (60 min antes) com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), AAS (300 mg/kg, v.o., grupo controle positivo), dexametasona (2 mg/kg, s.c., grupo controle positivo) ou veículo (tween 80 a 0,2%, v.o.). Na região s.pl. das patas contralaterais dos ratos que receberam o pré-tratamento com veículo foram injetados 100 μ L de salina a 0,9%/animal. O volume da pata foi medido com o auxílio de um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), observando-se o deslocamento da coluna de líquido, imediatamente antes da injeção s.pl. do agente edematogênico carragenina, sendo esta denominada medida basal. Medidas do volume da pata foram novamente realizadas em intervalos regulares de 1, 2, 3 e 4 h após a injeção da carragenina (HARRIS; SPENCER, 1962). Os resultados estão expressos como média $\pm$ E.P.M. da variação do volume (mL) da pata encontrada entre os grupos controle e tratados. Também foram calculados os valores de área sob a curva (ASC), utilizando a regra trapezoidal, em todos os grupos. A porcentagem de inibição no edema foi calculada com base na ASC.

4.6.2. Ensaio de mieloperoxidase (MPO) nas patas de ratos

O recrutamento de neutrófilos foi indiretamente medido pela atividade da MPO. Os animais provenientes do edema de pata foram eutanasiados após a 4ª hora e o tecido muscular da região s.pl. das patas estimuladas com carragenina e das contra-patas onde foi injetada apenas salina (0,9%, 100 μ L/pata) foi coletado, pesado, cortado em pedaços pequenos e mantido em tubos teste na presença de tampão fosfato [50 mM, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma Chem. Co, EUA)]. Cada amostra foi homogeneizada e alíquotas do homogenato foram aquecidas durante 2 h a 60°C para inativação da catalase endógena (OHTA; KONGO; KISHIKAWA, 2003) e, posteriormente, centrifugadas a 12.000xg por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO, conforme descrito a seguir. Em placa de 96 poços, os sobrenadantes foram adicionados a solução de di-hidrocloreto de *o*-dianisidina (Sigma Chem. Co, EUA; 0,167 mg/mL, preparada em tampão fosfato de potássio 50 mM contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância a 460 nm foram registradas e os

resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO)/mg de tecido, considerando-se 1 UMPO como a quantidade de enzima que degrada 1 μmol de H_2O_2 por min, gerando variação de absorvância de 0,0113 unidades de absorvância, conforme previamente descrito (BRADLEY et al., 1982; CAMARGO et al., 2008).

4.6.3. Peritonite em camundongos

Camundongos *Swiss* (20–30 g, $n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), dexametasona (2 mg/kg, s.c.) ou veículo (tween 80 a 0,2%, v.o.), e após 1 h foi injetada uma solução de carragenina i.p. (1%, 0,25 mL, diluída em salina), de acordo com a técnica modificada de Mendes et al. (2010). Após 4 h da injeção da carragenina, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (50 mg/kg, i.p.) e eutanasiados por deslocamento cervical. Para a coleta dos fluidos peritoneais foi utilizada solução salina contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 3 mL, i.p.). A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em esfregaço sob lâmina obtido por citocentrifugação (600 rpm/10 min), analisadas sob microscópio ótico baseado no critério morfológico normal. Os resultados foram expressos como número de leucócitos/mL e a porcentagem de inibição de leucócitos foi calculada pela fórmula: % inibição = $(1 - T/C) \times 100$, onde T representa a contagem de leucócitos dos grupos tratados e C representa a contagem de leucócitos do grupo controle.

4.7. Avaliação da atividade antinociceptiva

4.7.1. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

As contorções abdominais consistem de uma contração no músculo abdominal junto a um alongamento dos membros traseiros (TORNOS et al., 1999), induzidas pela injeção i.p. de ácido acético (solução a 0,6%, 0,1 mL/10 g) em camundongos (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959).

Os animais (camundongos *Swiss*, 20-30 g, $n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 ou 400 mg/kg), AAS (300 mg/kg, usado como controle positivo) ou veículo (tween 80 a 0,2%, usado como controle negativo) oralmente, 60 min antes da aplicação do estímulo doloroso. Para a observação das contorções abdominais, os animais foram dispostos em grupos de 3 em caixas plásticas e a avaliação foi feita por um único

observador. As contorções foram contadas durante um período de 20 min, começando 5 min após a administração do ácido acético.

4.7.2. Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado de acordo com o método descrito por Dubuisson e Dennis (1977), e posteriormente modificado por Hunskaar e Hole (1987).

Os camundongos (*Swiss*, 20-30 g, $n = 6$ /grupo) foram tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o., 60 min antes), morfina (10 mg/kg; i.p., 30 min antes) e AAS (300 mg/kg, v.o., 60 min antes) antes da injeção s.pl. da solução de formalina a 2% (20 μ L/pata traseira direita). O grupo controle negativo recebeu tween 80 (0,2% em salina 0,9%, 0,1 mL/10 g, v.o., 60 min antes).

O tempo que o animal gastou lambendo ou mordendo sua pata foi medido durante a primeira (0-5 min) e a segunda (15-30 min) fases do teste.

4.7.3. Teste da placa quente

Os animais (camundongos *Swiss*, 20-30 g, $n = 6$ /grupo) foram pré-tratados com o EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o., 30 min antes), morfina (3 mg/kg, i.p., 30 min antes), veículo (tween 80 a 0,2%, v.o., 30 min antes), naloxona (5 mg/kg, i.p., 60 min antes) + morfina (3 mg/kg, i.p., 30 min antes), ou naloxona (5 mg/kg, i.p., 60 min antes) + EEE da *C. pyramidalis* (400 mg/kg, v.o., 30 min antes) e, posteriormente, colocados individualmente sobre uma placa metálica (Insight, Brasil) aquecida a $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Os camundongos que se mantiveram na placa, em um ensaio 24 h antes do teste, por mais de 10 s sem apresentar reação ao estímulo, foram excluídos do teste (JACOB; TREMBLAY; COIOMEEL, 1974; JACOB; RAMABADRAN, 1978).

O tempo decorrido até o aparecimento de reações ao estímulo térmico (latência, em s), tais como lambendo, sapatear ou sacudir (*flinch*) a pata traseira, foi registrado como índice de nocicepção (WOOLFE; MACDONALD, 1944) nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 min após o tratamento. Um corte no período de 30 s foi imposto para evitar danos às patas, sendo portanto, o tempo de latência máximo.

4.8. Avaliação da atividade motora

4.8.1. Teste da barra giratória (*rota-rod*)

Para uma investigação prévia se o tratamento com o EEE da *C. pyramidalis* pode influenciar na atividade motora dos animais e, conseqüentemente, interferir no comportamento nociceptivo nos modelos experimentais, a atividade motora dos animais foi avaliada em um aparato de *rota-rod* (AVS, Brasil), de acordo com Duham e Miya (1957) com algumas modificações. Os camundongos (*Swiss*, 20 - 30 g, $n = 6/\text{grupo}$) capazes de se manter no aparato durante 180 s (7 rpm) foram selecionados 24 h antes do teste. Os animais selecionados receberam tratamento com veículo (tween 80 a 0,2%, v.o.), EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg, v.o., 30 min antes) ou diazepam (1,5 mg/kg, i.p., 30 min antes). Cada animal foi testado no aparelho e o tempo (em s) que permaneceram na barra foi registrado em 30, 60 e 120 min após a administração do tratamento.

4.9. Avaliação da atividade antioxidante

4.9.1. Peroxidação lipídica *in vitro*

Foi determinado o conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como indicativo de lipoperoxidação, conforme previamente descrito (GELAIN et al., 2004). Um sistema *in vitro* de produção de radicais com 5 mM de 2,2-azobis[2-metilpropionamidina] di-hidrocloreto (AAPH) foi utilizado, e a capacidade do EEE de prevenir ou aumentar o dano oxidativo causado por esse sistema em uma preparação de lipossomos (gema de ovo a 1%, p/v, 20 mM tampão fosfato, pH 7,4 sonificado por 10 s em potência 4) foi quantificada. Após incubação por 1 hora com o EEE da *C. pyramidalis* nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 µg/mL, as amostras tiveram as proteínas precipitadas pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 20%, foram centrifugadas (1200xg por 10 min) e o sobrenadante incubado com ácido tiobarbitúrico (TBA, solução a 0,67%) em banho a 95°C por 20 min. Após resfriamento em banho de gelo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (535 nm), a concentração de TBARS calculada usando o coeficiente de absorção $1,56 \times 10^5/\text{M} \times \text{cm}$ e os resultados, em triplicata, expressos em percentual de malondialdeído (MDA), o qual condensa-se com o TBA produzindo cromógenos com absorvidade molar no espectro visível. O sistema contendo o AAPH, gema de ovo a 1% e tampão fosfato foi considerado como indutor de 100% de dano lipoperoxidativo (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990). Como controle

padrão utilizou-se a vitamina C (Sigma Chem Co, EUA; 1,76 mg/mL), em triplicata. Para normalizar os resultados encontrados, todos os valores obtidos foram subtraídos do valor do branco, 69,92% (gema de ovo a 1% em tampão fosfato).

4.10. Análise estatística

Os resultados da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva estão expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (E.P.M.) de 6 animais por grupo. Os ensaios *ex vivo* e *in vitro* foram realizados em triplicata e estão apresentados como média $\pm$ E.P.M. A avaliação estatística dos dados foi realizada usando análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida do pós-teste de Tukey ou teste-t para comparação entre dois grupos. Valores com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Prospecção fitoquímica

As classes de metabólitos secundários reveladas na prospecção fitoquímica preliminar do EEE da *Caesalpinia pyramidalis* foram fenóis, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos e saponinas, conforme representado na tabela 3.

Tabela 3: Prospecção fitoquímica preliminar do EEE da *C. pyramidalis*

Classes de metabólitos secundários	Reagentes/Reações	Resultados
Fenóis totais	Reagente de Folin-Ciocalteu	+
Taninos	Precipitação com FeCl ₃ / solução ácida aquecida	+
Flavonas, flavonóis, flavanonóis e xantonas	pH ácido (3,0)	+
Flavonas, flavonóis, flavanonóis, xantonas, chalconas e auronas	pH básico (8,5)	+
Leucoantocianidinas	Solução alcalina	+
Flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas	Mg granulado / solução ácida	-
Catequinas (taninos catéquicos)	Solução ácida / aquecimento	+
Esteróides	Reação de Lieberman- Burchard	+
Triterpenos	Reação de Lieberman- Burchard	+
Heterosídeos saponínicos	CHCl ₃	+

O sinal (+) indica presença e (-) indica ausência do constituinte químico.

5.2. Edema de pata

Conforme demonstrado na Figura 2A, apenas a dose de 400 mg/kg do EEE reduziu de forma significativa ($P < 0,05$) a formação do edema de pata induzido pela carragenina comparando-se com o grupo que foi submetido somente ao pré-tratamento com veículo; efeito este observado a partir da 2ª hora. O AAS ($P < 0,001$) e a dexametasona ($P < 0,01$) também foram capazes de reduzir a formação do edema da pata a partir da 2ª hora, conforme esperada ação farmacológica (Figura 2A).

A $ASC_{0-4\text{ h}}$ formada após a injeção s.pl. da carragenina a 1% no grupo que recebeu pré-tratamento com o veículo apenas foi de $4,61 \pm 0,72\text{ mL} \times \text{h}$ (Figura 2B). Foi observado que a injeção s.pl. de carragenina em animais pré-tratados com veículo aumentou ($P < 0,001$) a formação de edema quando a comparação foi realizada com a injeção s.pl. de salina a 0,9% nas contra-patas destes mesmos animais ($4,61 \pm 0,72$ e $0,47 \pm 0,07\text{ mL} \times \text{h}$, respectivamente). O pré-tratamento dos animais com a dose de 400 mg/kg do EEE da *Caesalpinia pyramidalis* causou inibição significativa ($P < 0,05$) na formação do edema induzida pela carragenina de 41,3% (Figura 2B). A dexametasona inibiu a formação do edema em 54,4% ($P < 0,001$) e o AAS mostrou inibição de 62,7% ($P < 0,001$) comparando-se com o grupo de animais que recebeu o veículo (Figura 2B).

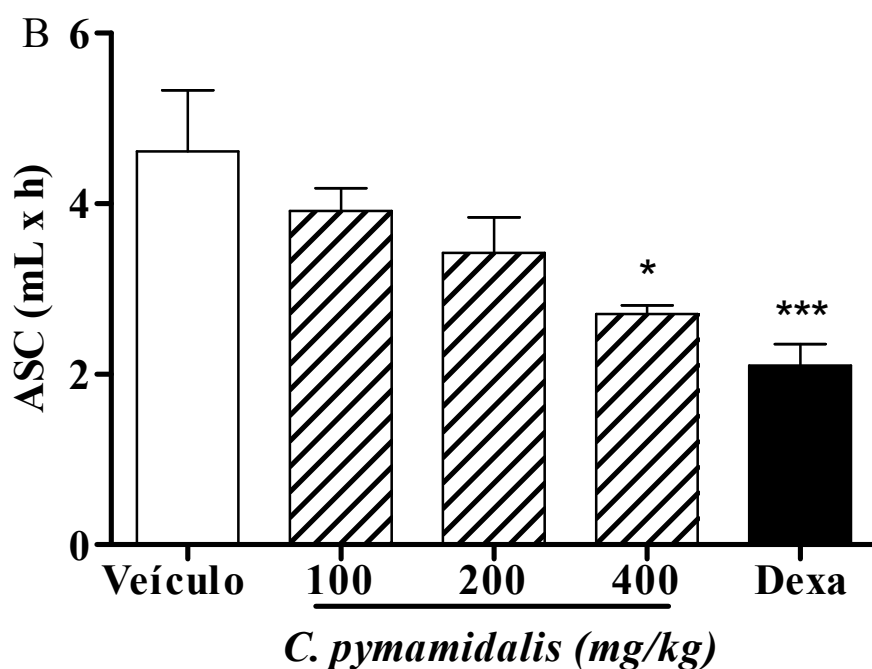
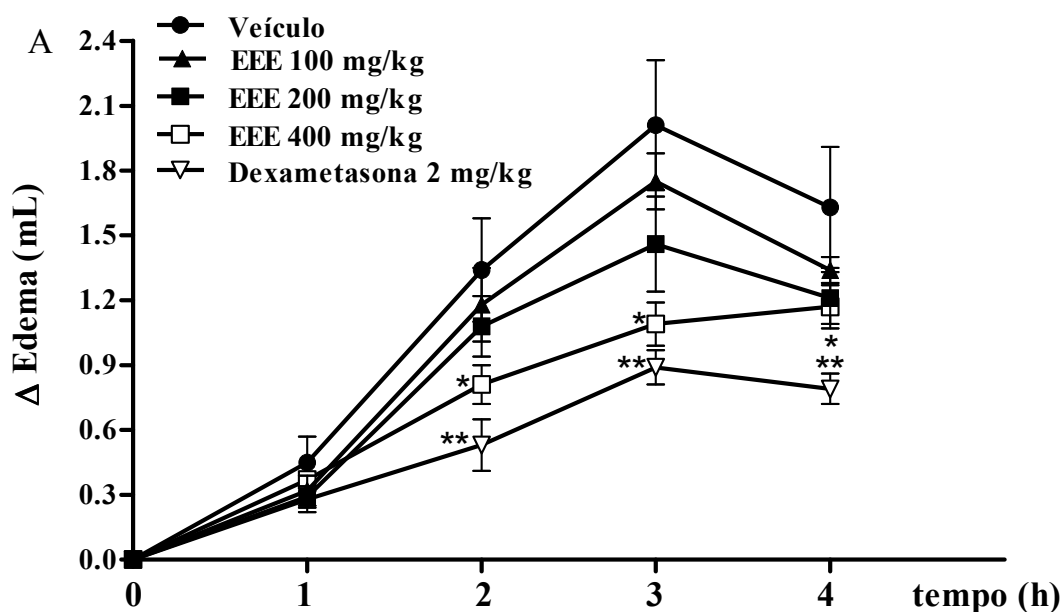


Figura 2: Curva tempo-resposta (A) e gráfico da área sob a curva (B) do edema de pata induzido por carragenina em ratos. Animais pré-tratados com veículo (tween 80 a 0,2%), AAS (300mg/kg), dexametasona (2 mg/kg) ou EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg), 1 h antes da injeção de carragenina (1%, 100 μ L, s.pl.). As medidas foram realizadas nos tempos de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção subplantar do agente flogístico na pata traseira direita. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, *P < 0,05 e **P < 0,01 em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.3. Ensaio da atividade da mieloperoxidase nas patas de ratos

Foi observado que a injeção s.pl. de carragenina em animais pré-tratados com veículo aumentou ($P < 0,001$) a atividade da mieloperoxidase quando a comparação foi realizada com o grupo de animais que recebeu a injeção s.pl. de salina e o pré-tratamento com veículo ($7,12 \pm 0,94$ e $0,00 \pm 0,0$ UMPO/mg tecido, respectivamente). O pré-tratamento com o EEE da *Caesalpinia pyramidalis* foi capaz de diminuir a migração de neutrófilos induzida por carragenina para o local do dano tecidual de forma significativa ($P < 0,05$) na dose de 400 mg/kg ($4,48 \pm 0,54$ UMPO/mg tecido) em comparação ao grupo de animais pré-tratados com o veículo (Figura 3). Conforme esperado, os tecidos das patas dos animais que receberam dexametasona (2 mg/kg) no pré-tratamento mostraram uma baixa atividade da enzima ($2,61 \pm 0,33$ UMPO/mg tecido), logo, uma baixa migração de neutrófilos para a pata ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com o veículo (Figura 3).

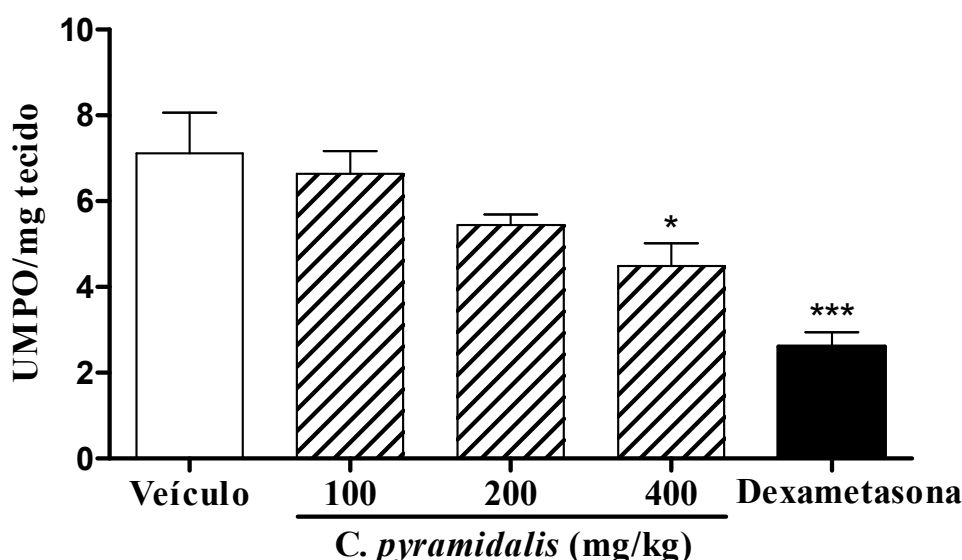


Figura 3: Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase em patas de ratos. Grupos de ratos foram pré-tratados com veículo (tween 80 a 0,2%), dexametasona (2 mg/kg) ou EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg), 1 h antes da injeção de carragenina (1%, 100 µL/s.pl.). Após 4h, o tecido da pata foi coletado, preparado o homogenato e lido em leitor de placas a 460 nm. Cada valor representa a média ± E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$, em relação ao grupo veículo. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.4. Peritonite e contagens total e diferencial de leucócitos do lavado peritoneal

A injeção de carragenina (1%, 250 µL, i.p.) nos animais previamente tratados com veículo induziu migração de $7,22 \pm 0,99 \times 10^6$ leucócitos/mL (Figura 4). Apenas a dose de 400 mg/kg do EEE da planta mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) com redução de

58,4% ($3,00 \pm 0,42 \times 10^6$ leucócitos/mL) na migração leucocitária para a cavidade peritoneal comparando-se com o veículo (Figura 4). O anti-inflamatório esteroide dexametasona (2 mg/kg, v.o., controle padrão) reduziu a migração em 90,6% ($0,68 \pm 0,40 \times 10^6$ leucócitos/mL, $P < 0,001$) (Figura 4).

As doses de 200 e 400 mg/kg do EEE da *C. pyramidalis* provocaram diminuição significativa ($P < 0,001$) na contagem diferencial de polimorfonucleares do lavado peritoneal em 42,8% e 82,7% ($3,18 \pm 0,11$ e $0,96 \pm 0,10 \times 10^6$ polimorfonucleares/mL, respectivamente), predominantemente neutrófilos, apresentando o mesmo perfil da dexametasona (2 mg/kg, $P < 0,001$), quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com veículo (Figura 4).

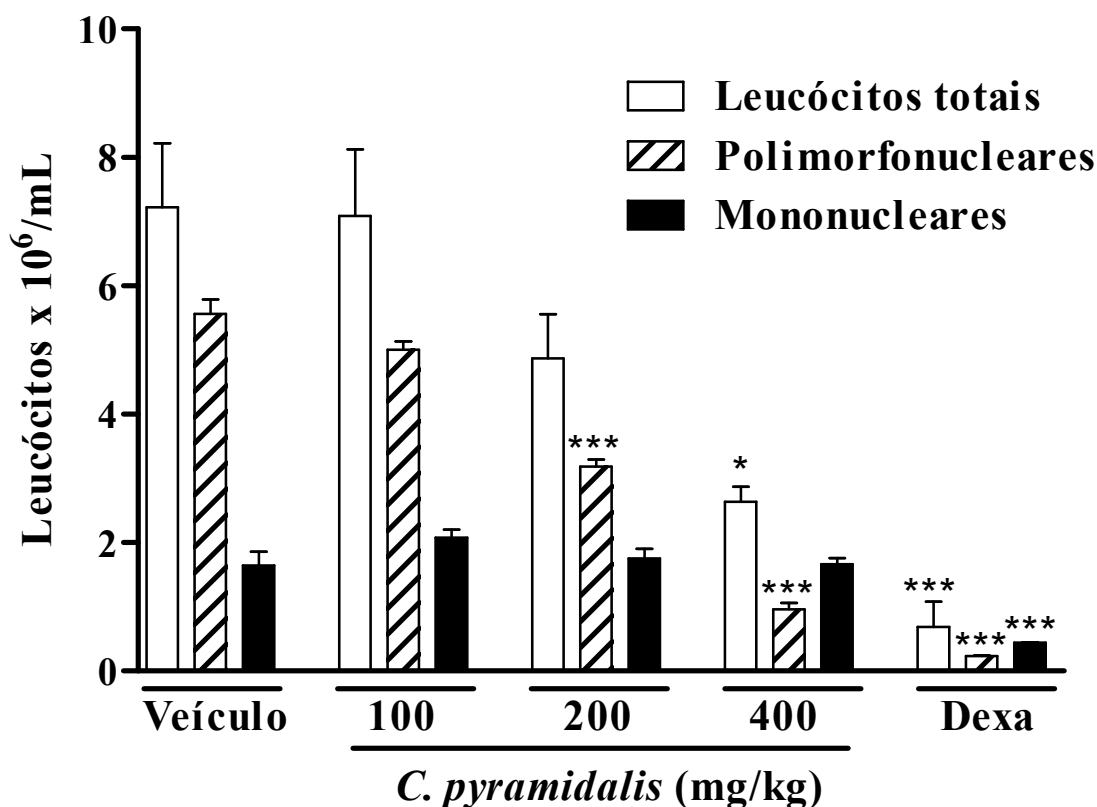


Figura 4: Efeito do EEE da *C. pyramidalis* sobre a migração de leucócitos induzida pela carragenina para a cavidade peritoneal em camundongos após 4h. Grupos de camundongos foram pré-tratados com veículo (tween 80 a 0,2%), dexametasona (2 mg/kg) ou EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg), 1h antes da injeção de carragenina (1%, 0,25 mL/cavidade). A contagem de células foi realizada 4h após a injeção de carragenina. Cada valor 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 seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.5. Contorções abdominais

As doses de 100, 200 e 400 mg/kg do EEE da *Caesalpinia pyramidalis* reduziram de forma dose-dependente ($P < 0,001$) em 20,9%, 41,7% e 69,5%, respectivamente, as contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos (Figura 5). O AAS na dose de 300 mg/kg também inibiu as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético de forma significativa ($P < 0,001$) em 75,9% (Figura 5).

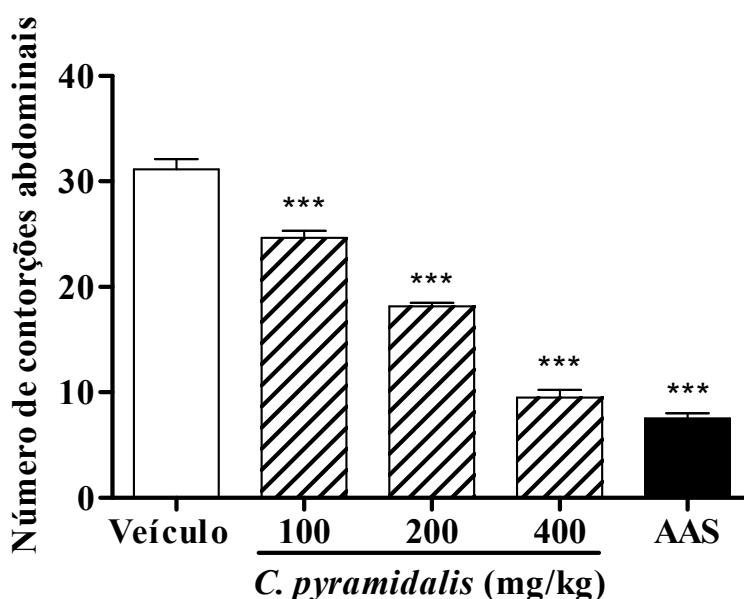


Figura 5: Contorções abdominais induzidas por ácido acético. Grupos de camundongos foram pré-tratados com veículo (tween 80 a 0,2%), AAS (300 mg/kg) ou EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg), 1 h antes da injeção de ácido acético 0,6% (0,1 mL/10 g de peso). O número das contorções abdominais foi observado por um período de 20 min, iniciando 5 min após a administração do ácido acético. Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.6. Teste da formalina

O EEE da *C. pyramidalis*, nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, inibiu de forma significativa ($P < 0,05$) o tempo de lambida/mordida na pata dos camundongos nas 1ª e 2ª fases do teste da formalina em comparação ao grupo de animais pré-tratados com o veículo (Figura 6). Conforme esperada ação farmacológica, a morfina (10 mg/kg) inibiu ambas as fases do teste ($P < 0,05$) e o AAS (300 mg/kg) inibiu apenas a segunda fase ($P < 0,05$) (Figura 6).

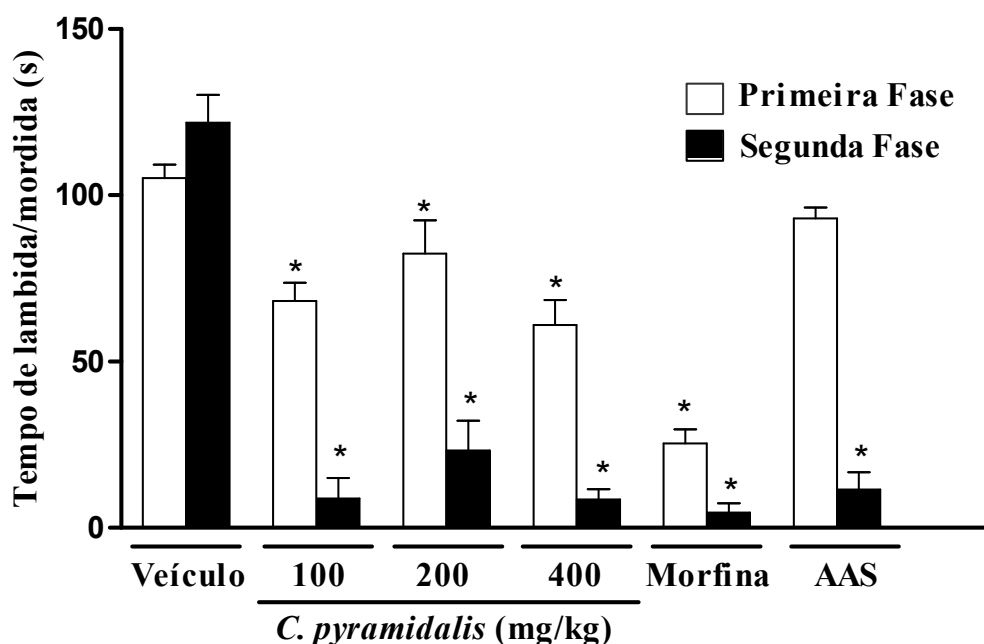


Figura 6: Efeito do EEE da *C. pyramidalis* no teste da formalina. Grupos de camundongos foram pré-tratados com o veículo (tween 80 a 0,2%), AAS (300 mg/kg), morfina (10 mg/kg) ou EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg). Posteriormente, foi administrado formalina a 2% (20 μ L, s.pl.) na pata posterior direita. O tempo que o animal passou lambendo e/ou mordendo sua pata foi cronometrado em dois períodos: durante a primeira fase (0-5 min após a injeção de formalina), e durante a segunda fase (15-30 min após a injeção de formalina). Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, * $P < 0,05$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.7. Teste da placa quente

As doses de 100, 200 e 400 mg/kg ($P < 0,05$) do EEE da *C. pyramidalis* aumentaram o tempo de latência, em s, dos camundongos na placa quente em todos os tempos observados ($P < 0,05$), quando comparada com o grupo que recebeu a administração do veículo (tween 80 a 0,2%), conforme mostrado na tabela 4. O grupo que recebeu morfina (3 mg/kg), um analgésico opióide, apresentou elevado tempo de latência ($P < 0,001$). Os efeitos antinociceptivos observados quando administrada a dose de 400 mg/kg do EEE da *C. pyramidalis* ou de 3 mg/kg de morfina, em outros grupos de animais, foram revertidos pela naloxona (5 mg/kg) (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito antinociceptivo do EEE da *C. pyramidalis* no teste da placa quente

Tratamento	Dose (mg/kg)	Tempo de latência (s)				
		30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
Veículo (tween 80 a 0,2%)	-	8,8 ± 0,9	10,2 ± 0,4	8,5 ± 0,5	9,8 ± 0,5	8,7 ± 0,8
EEE da <i>C. pyramidalis</i>	100	12,3 ± 0,7*	13,8 ± 2,2*	14,6 ± 1,7**	11,6 ± 0,5*	10,3 ± 1,1*
	200	13,1 ± 1,3*	15,4 ± 1,7*	13,8 ± 1,4**	11,5 ± 0,9*	10,1 ± 1,1*
	400	12,5 ± 0,9*	17,5 ± 1,9**	18,0 ± 2,3**	18,1 ± 1,8**	14,8 ± 0,3***
Morfina	3	30,0 ± 0,0***	30,0 ± 0,0***	29,0 ± 1,7***	28,7 ± 1,5***	30,0 ± 0,0***
Naloxona + morfina	5 + 3	11,4 ± 4,4 ^{###}	11,6 ± 5,8 ^{###}	10,5 ± 4,9 ^{###}	9,7 ± 6,2 ^{###}	8,5 ± 2,9 ^{###}
Naloxona + EEE	5 + 400	6,6 ± 0,4 ^{†††}	10,6 ± 0,7 ^{††}	8,6 ± 1,6 ^{††}	11,3 ± 1,6 [†]	9,0 ± 1,5 ^{††}

O tratamento com naloxona foi realizado 30 min antes da morfina ou EEE da *C pyramidalis* (400 mg/kg).

Os valores representam a média ± E.P.M. com ANOVA seguida pelo teste de Tukey, ou teste t, onde os símbolos denotam *P < 0,05, **P < 0,01 e ***P < 0,001 (*versus* veículo), ^{###}P < 0,001 (*versus* morfina) e [†]P < 0,05, ^{††}P < 0,01 e ^{†††}P < 0,001 (*versus* EEE 400 mg/kg).

5.8. Teste da barra giratória (rota-rod)

Os camundongos que receberam as doses de 100, 200 e 400 mg/kg do EEE da *C. pyramidalis* não apresentaram alteração na atividade motora (Figura 8). Como esperado, o diazepam (1,5 mg/kg), reduziu o tempo dos animais no *rota-rod* após 30 min ($14,83 \pm 2,57$ s, $P < 0,001$), 60 min ($31,17 \pm 3,41$ s, $P < 0,001$) e 120 min ($159,17 \pm 2,70$ s, $P < 0,05$) quando comparado ao grupo que recebeu o veículo (Figura 7).

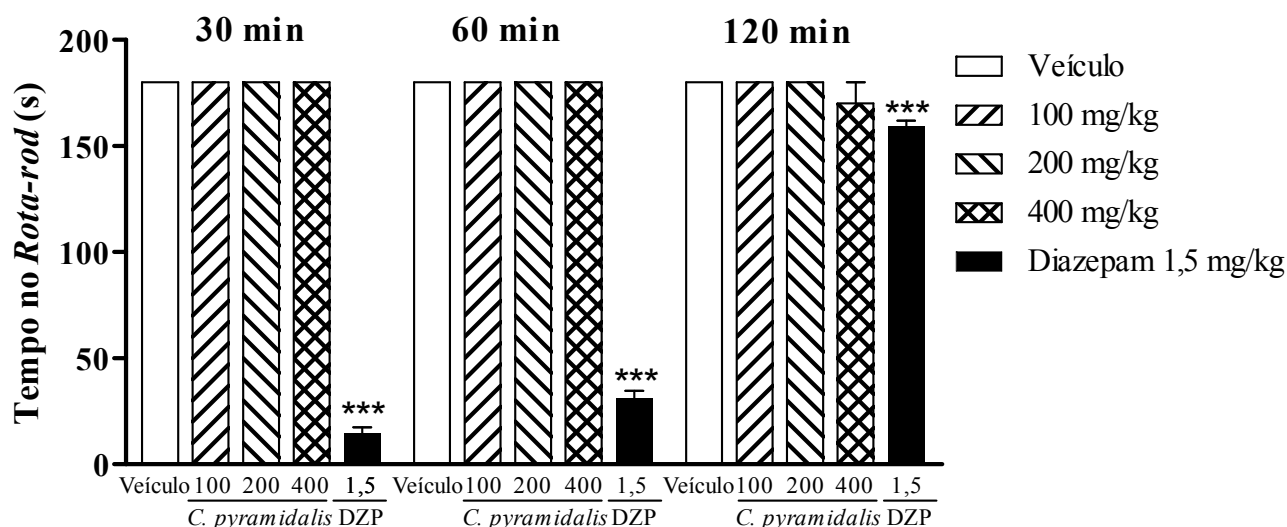


Figura 7: Efeito do EEE da *C. pyramidalis* no teste da coordenação motora. Grupos de animais foram pré-tratados com veículo (tween 80 a 0,2%), EEE da *C. pyramidalis* (100, 200 e 400 mg/kg) ou diazepam (1,5 mg/kg). Após seleção dos animais 24 h antes do teste, estes foram submetidos ao teste no *rota-rod* e avaliação foi realizada 30, 60 e 120 min após o tratamento. Os asteriscos denotam diferenças estatísticas, *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($n = 6$ animais/grupo).

5.9. Peroxidação lipídica – TBARS

O EEE nas concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ mostrou atividade antioxidante reduzindo significativamente ($P < 0,001$) a peroxidação lipídica ao diminuir a produção de TBARS em relação ao sistema (100% - dano oxidativo pelo AAPH) em 77,66% e 83,41%, respectivamente, conforme apresentado na figura 8. A vitamina C (antioxidante padrão) mostrou uma redução na produção de MDA de 90,26% ($P < 0,001$) (Figura 8).

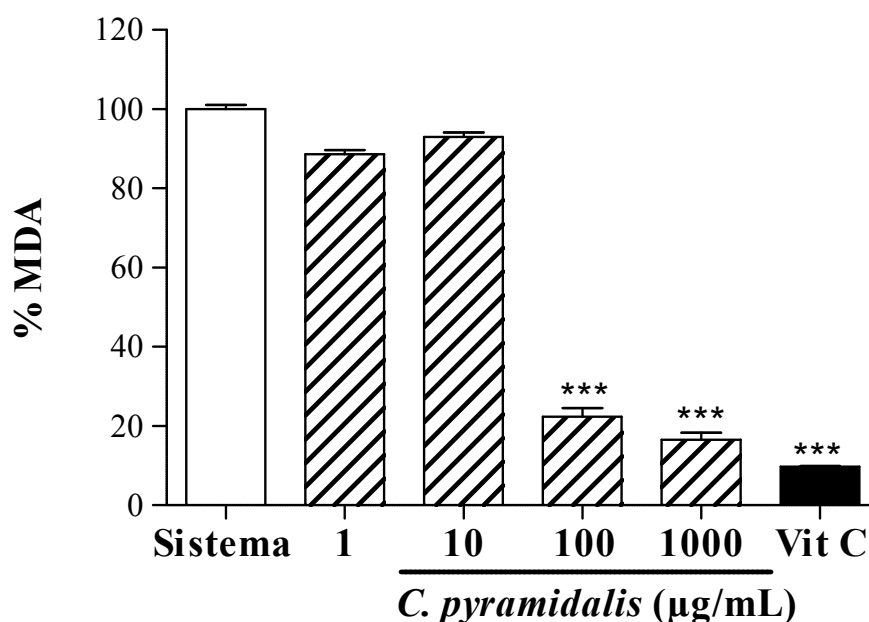


Figura 8: Inibição da peroxidação lipídica provocada pelo ácido tiobarbitúrico. Um sistema *in vitro* de produção de radicais com AAPH (2 mM) em uma preparação de lipossomos (gema de ovo a 1%, p/v, em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4) foi incubado com concentrações de 1-1000 µg/mL do EEE da *C. pyramidalis* ou vitamina C (1,76 µg/mL). Os valores estão descontados do valor do branco, 69,92% (gema de ovo 1% em tampão fosfato). Cada valor representa a média $\pm$ E.P.M. da porcentagem de MDA formada após a subtração dos valores observados no grupo sem dano oxidativo. Os asteriscos representam diferenças estatísticas, ***P < 0,001 em relação ao sistema. ANOVA seguida pelo teste de Tukey (triplicata).

6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste estudo mostram-se interessantes por ajudar a validar o uso popular da entrecasca da *C. pyramidalis* e evidenciar a atividade antinociceptiva/analgésica, antes não explorada pela população. A limitação do uso de anti-inflamatórios e analgésicos devido os efeitos adversos apresentados por estes, como a irritação gástrica, são um dos motivos que levam a população ao uso de plantas medicinais na terapêutica da inflamação (PERAZZO et al., 2007), além da dificuldade de acesso aos fármacos.

Os constituintes químicos encontrados na prospecção fitoquímica entram em concordância com os estudos de Mendes et al. (2000) e Bahia et al. (2005) realizados com a *Caesalpinia pyramidalis*, onde foram encontrados flavonóides, taninos, saponinas e outros produtos. Possivelmente, os metabólitos secundários são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatória (derivados fenólicos, taninos, flavonóides e saponinas) e antioxidante (taninos, terpenos e derivados fenólicos) da planta (OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007), dando suporte ao seu uso etnofarmacológico. Outra espécie do mesmo gênero, a *Caesalpinia*

bonducella, apresentou as mesmas classes de produtos (ARCHANA et al., 2005) encontradas neste estudo enfatizando a importância do estudo de plantas do gênero *Caesalpinia*.

Os modelos comumente utilizados como ferramenta farmacológica para avaliar o processo inflamatório são úteis para a validação de novas substâncias utilizadas popularmente na terapêutica da inflamação.

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo clássico de *screening* de compostos anti-inflamatórios, para investigar a fisiopatologia da inflamação aguda local e avaliar o efeito antiedematogênico de produtos naturais, exibindo um alto grau de reprodutibilidade. Em ratos, a resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica acompanhada de marcante formação de edema, resultante de uma rápida produção de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, 5-HT e bradicinina (primeira fase), que é sustentada pela liberação de PG e NO (segunda fase), com pico na terceira hora, produzidos pelas isoformas induzíveis da COX (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS), respectivamente (DI ROSA; GIROUDI; WILLOUGHBY, 1971; SEIBERT et al., 1994; SALVEMINI et al., 1996; NANTEL et al., 1999; BUCCI et al., 2005; CICALA et al., 2007).

O resultado apresentado neste trabalho mostra que o EEE da *C. pyramidalis* inibiu significativamente a formação de edema na dose de 400 mg/kg. Sugere-se então que os mediadores da inflamação envolvidos neste mecanismo são as cininas, as PG e o NO por diminuir a formação do edema entre a 2ª e 4ª h. As culturas celulares com extrato da *Caesalpinia pulcherrima* em estudos de Rao, Fang e Tzeng (2005) mostraram, após indução de inflamação em patas de ratos, diminuição da presença de mediadores como cininas e prostaglandinas.

Após dano tecidual, ocorrem migração e ativação dos leucócitos polimorfonucleares (PMN), principalmente de neutrófilos possuidores de grânulos azurofílicos que contêm a enzima MPO, a qual é capaz de modular a resposta inflamatória devido às substâncias oxidantes resultantes da reação com o peróxido de hidrogênio e cloreto existentes no meio (VEEN; WINTHER; HEERINGA, 2009; TILL et al., 2010).

O EEE da *Caesalpinia pyramidalis* conseguiu diminuir a atividade de MPO na dose de 400 mg/kg, o que indica uma redução na migração do número de neutrófilos para o local do dano tecidual e, conseqüentemente, da inflamação no local. Estudos realizados por Witko-Sarsat e Descamps-Latscha (1994) discutiram que o excesso de MPO no tecido pode causar inflamação aguda ou crônica e aumentar os níveis do TNF- α e de interferon gama (IFN- γ).

A inflamação induzida pela carragenina envolve migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, como NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (SALVEMINI et al., 1996; HERWIG et al., 2002; LORAM et al., 2007). Pode-se inferir que a dose de 400 mg/kg do EEE, assim como o anti-inflamatório dexametasona na dose estabelecida de 2 mg/kg, inibiram a formação de alguns desses mediadores no modelo de peritonite provocada por carragenina, inibindo assim a inflamação no peritônio dos camundongos. Os estudos realizados por Albuquerque et al. (2009) mostraram que as COX, o NO e as citocinas, principalmente o TNF- α , estão envolvidos no processo inflamatório provocado por carragenina no peritônio. A peritonite é uma condição inflamatória frequente com alta taxa de morbimortalidade e de etiologia infecciosa bastante ampla incluindo bactérias, fungos e parasitas (KOLACZKOWSKA; ARNOLD; OPDENNAKER, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para os sítios inflamatórios, seguidos pelos monócitos. O recrutamento ocorre quando a célula se adere ao endotélio inflamado ligando-se às integrinas e liberando substâncias quimiotrativas. A infiltração dos PMNs é regulada pelas moléculas de adesão, citocinas e componentes da matriz extracelular do vaso e do tecido adjacente (TAYLOR; GALLO, 2006; KASUGA et al., 2010). A redução no número de PMN na cavidade peritoneal de animais injetados com carragenina pela dose de 400 mg/kg do EEE da *C. pyramidalis* corrobora com o resultado de diminuição da atividade da MPO mensurada no modelo de edema de pata. O fator estimulador de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), o LTB₄ e penetração de PMN provenientes dos vasos sanguíneos ao redor do tecido através do endotélio prolongam a vida dos granulócitos (ARNHOLD; FLEMMING, 2010).

O efeito antinociceptivo do EEE da *C. pyramidalis* foi avaliado utilizando três modelos de nocicepção, as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, o teste da formalina e o teste da placa quente. O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético investiga atividade periférica, enquanto o teste da formalina investiga central e periférica (QUEIROZ et al., 2010). Este último modelo é constituído de duas fases: a primeira fase, transitória, é causada pelo efeito direto da formalina nas fibras C sensoriais, e a segunda fase, prolongada, está associada com o desenvolvimento da resposta inflamatória e com a liberação de mediadores nociceptivos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; JAISHREE et al., 2009). A injeção s.pl. de formalina foi descrita por Omote et al. (2001) como indutor de produção e liberação de NO que é sugerido como sendo componente essencial da resposta pró-inflamatória/nociceptiva por estimular a produção e liberação de citocinas, EROs e prostanóides (MARCINKIEWICZ et al., 1995; SAUTEBIN, 1995).

Foi reportado por Du et al. (2007) que a SP e a bradicinina participam na resposta da primeira fase, e a histamina, a 5-HT, a PG e a bradicinina na resposta da segunda fase no teste da formalina, onde drogas de ação central, como os narcóticos, inibem ambas as fases igualmente, enquanto que drogas anti-inflamatórias inibem apenas a segunda fase (EL-HABAZI et al., 2006), ações estas que foram reproduzidas neste estudo com os controles padrões utilizados.

O EEE da *Caesalpinia pyramidalis* mostrou ter atividade antinociceptiva periférica nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg. Para comprovação desta atividade antinociceptiva periférica foram realizados os testes das contorções abdominais e formalina, enquanto que para avaliar possíveis efeitos centrais se fez necessário a realização do teste da placa quente para confirmar o efeito observado na primeira fase do teste da formalina.

O teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, apesar de ter baixa especificidade, possui boa sensibilidade, funcionando assim, como um modelo de *screening* para avaliar atividade antinociceptiva de extratos de plantas (ARCHANA et al., 2005). Além disso, como um modelo de dor visceral, mostra-se útil para avaliar a atividade antinociceptiva periférica (VERMA et al., 2005; DU et al., 2007). Ribeiro et al. (2000) e Lucena et al. (2007) demonstraram que a atividade nociceptiva do ácido acético pode ser devido a liberação de citocinas, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-8 via modulação de macrófagos e mastócitos peritoneais residentes.

Os experimentos realizados por Archana et al. (2005) com a *Caesalpinia bonducella* demonstraram que as doses de 100 e 300 mg/kg do extrato desta planta diminuíram significativamente as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Neste trabalho observamos que o EEE da *C. pyramidalis* inibiu as contorções abdominais nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, mostrando-se sugestiva no tratamento da dor.

Na avaliação da ação central do EEE da *C. pyramidalis* foi utilizado o teste da placa quente, considerado sensível a fármacos que atuam modulando a resposta dolorosa em nível espinal e supraespinal (YAKSH; RUDY, 1977; SILVA et al., 2006). Os resultados sugerem que a planta promove efeito analgésico central, como evidenciado pelo tempo de resposta prolongado dos camundongos quando sujeitos ao estímulo nociceptivo (calor). Foi observado que apenas as doses de 100, 200 e 400 mg/kg conseguiram aumentar o tempo de latência dos animais na placa quente. Para demonstrar o envolvimento do sistema opióide na atividade central da *C. pyramidalis*, animais que receberam a dose de 400 mg/kg do EEE e a naloxona (5 mg/kg), antagonista de receptores opióides, reverteram a ação antinociceptiva da mesma dose da planta administrada isoladamente até os níveis daqueles que receberam apenas o

veículo. Estudos sugerem que a depressão do SNC e o efeito relaxante muscular não-específico podem reduzir a resposta de coordenação motora a qual pode invalidar os resultados do teste de nocicepção (DE SOUSA; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2006). No entanto, os resultados revelaram que os camundongos tratados o EEE da *C. pyramidalis*, nas doses avaliadas, não apresentaram nenhuma alteração no teste de *rota-rod*.

Muitas evidências mostram que a produção de radicais livres no sítio inflamatório contribui para ocasionar dano tecidual e estímulo nociceptivo (ROKYTA et al., 2003), com isso este estímulo aumenta a produção de radicais livres provocando lipoperoxidação. No entanto, o uso de antioxidantes aumenta as chances de proteção contra as consequências da nocicepção (JAISHREE et al., 2009). As EROs e as ERNs podem atuar como substâncias pró-inflamatórias *in vivo* pela ativação dos genes do TNF- α , IL-1 β e IL-6 através da ativação redox-sensível da transcrição do NF- κ B (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

O consumo de antioxidantes naturais tem sido associado à baixa incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como aquele causado pela inflamação (BOLIGON et al., 2009). O dano oxidativo tem uma associação reconhecida com mais de cem doenças, assim como processos normais de envelhecimento (GHANSANFARI et al., 2006). Existe uma forte correlação de TBARS como marcadores de lipoperoxidação e produtos que provocam dano oxidativo ao DNA (CHEN; WU; HUANG, 2005). Por isso, foi realizado o teste das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico para avaliar a atividade antioxidante do EEE da *C. pyramidalis*.

O MDA, um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação lipídica, em condições apropriadas de incubação, reage com substâncias nucleofílicas para produzir cromógenos com absorvidade molar no espectro visível (BENZIE, 1996). A sua condensação com o TBA forma produtos que podem ser determinados por absorção no comprimento de onda de 532 nm (LIMA; ABDALLA, 2001).

O EEE da *C. pyramidalis* nas concentrações de 100 e 1000 μ g/mL diminuiu o dano oxidativo induzido pelo sistema de AAPH que causa peroxidação pela ação de EROs em preparação de lipossomos (gema de ovo) a partir da ação do H₂O₂. A lipoperoxidação é um processo autocatalítico, consequência comum da morte celular, porém causa dano ao tecido em condições inflamatórias (SRINIVASAN et al., 2007). Conforme a atividade antioxidante esperada, a vitamina C (antioxidante padrão) consome os radicais livres gerados a partir da oxidação provocada pelo AAPH. Nessa reação é importante ter um controle que funciona como branco da reação, que por sua vez apresenta oxidação basal, ou seja, mostra apenas a produção de MDA pela preparação de lipossomos (REDDY et al., 2007) e precisa ser

descontado dos valores obtidos nas outras amostras para se considerar apenas o dano oxidativo induzido pelo AAPH. A presença de metabólitos secundários com conhecida atividade antioxidante como taninos, flavonóides, esteróides e terpenóides está envolvida no efeito redox-protetor nas células (BOLIGON et al., 2009). Resultados da avaliação antioxidante da *Caesalpinia pyramidalis* realizados por Alviano et al. (2008) corroboram com os achados deste trabalho. Outras espécies do mesmo gênero como a *C. bonducella* e a *C. digyna* também apresentam atividade antioxidante, conforme avaliado bioquimicamente por Archana et al. (2005) e Srinivasan et al. (2007), respectivamente. As ações anti-inflamatória e antinociceptiva do EEE podem estar relacionadas, ao menos em parte, com a habilidade redox-protetora do extrato, ao prevenir a formação de radicais que ativam mediadores pró-inflamatórios.

Estas alterações biológicas devem estar relacionadas, ao menos em parte, à presença de taninos, terpenóides, flavonóides e saponinas.

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que a planta *Caesalpinia pyramidalis* possui atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, embasando o uso popular como agente anti-inflamatório; porém, necessita-se de continuidade nos estudos para confirmar o mecanismo envolvido nas suas ações. A atividade antinociceptiva envolve, provavelmente, inibição de mediadores periféricos e mecanismos centrais.

Existe a necessidade de estudo dos mediadores envolvidos na atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da *C. pyramidalis*, assim como da confirmação de sua atividade antioxidante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M.. **Medical and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil.** Journal of Ethnopharmacology, v. 111, p. 383-395, 2007.

ALBUQUERQUE, T. M.; ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, J. G.; FIGUEIREDO, I. S. T.; TEIXEIRA, C. M.; BITENCOURT, F. S.; SECCO, D. D.; ARAÚJO, E. S.; LEÃO, A. M.;

RAMOS, M. V. **Vascular permeability, neutrophil migration and edematogenic effects induced by the latex of *Cryptostegia grandiflora*.** Toxicon, v. 53, p. 15-23, 2009.

ALBUQUERQUE, U .P. **Re-examining hypotheses concerning the use and knowledge of medicinal plants: a study in the caatinga vegetation of NE Brazil.** Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v. 2, n. 30, 2006.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIS, M. B. **Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semiarid location in the northeaster Brazil.** Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, v. 2, n. 15, p. 1-7, 2006.

ALVES, E. U.; CARDOSO, E. A.; BRUNO, R. L. A.; ALVES, A. U.; GALINDO, E. A.; JUNIOR, J. M. B. **Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul.** Revista Árvore, v. 31, n. 3, p. 405-415, 2007.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; SOUZA, M. M.; BOLOGNESE, A. M. **In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine.** Archives of Oral Biology, v. 56, n. 6, p. 545-552, 2008.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark Wood of *Austroplenckia populnea*.** Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 464-471, 2007.

ARCHANA, P.; TANDAN, S. K.; CHANDRA, S.; LAL, J. **Antipyretic and analgesic activities of *Caesalpinia bonducella* seed kernel extract.** Phytotherapy Research, v. 19, n. 5, p. 376-381, 2005.

ARNHOLD, J.; FLEMMING, J. **Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity.** Archives of Biochemistry and Biophysics, Article in Press, 2010.

ARRUDA, J. L.; SWEITZER, S.; RUTKOWSKI, M. D.; DELEO, J. A. **Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in**

the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. Brain Research, v. 879, p. 216-225, 2000.

ARUOMA, O. I. **Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods.** Mutation Research, v. 523-524, p. 9-20, 2003.

BABIOR, B. M. **Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes.** New England Journal of Medicine, v. 298, p. 659-668, 1978.

BADAMI, S.; MOORKATH, S.; RAI, S. R.; KANNAN, E.; BHOJRAJ, S. **Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 26, n.11, p. 1634-1637, 2003.

BAHIA, M. V. **Estudo químico da *Caesalpinia pyramidalis* (Leguminosae).** Salvador – BA, 2002, p. 103. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia.

BAHIA, M. V.; SANTOS, J. B.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. **Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae).** Journal of Brazilian Chemistry Society, v. 16, n. 6B, p. 1402-1405, 2005.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo.** Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 1, 2006.

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

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. **Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw.** Brain Research, v. 924, p. 219-228, 2002.

BENZIE, I. F. F. **Lipid peroxidation: a review of auses, consequences, measurements and dietary influences.** Internacinal Journal of Food, Science and Nutrition, v. 47, p. 233-261, 1996.

BOLIGON, A. A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B. T.; ATHAYDE, M. L. **Antioxidant activities of flavonol derivates from leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss.** Bioresource Technology, v. 100, p. 6592-6598, 2009.

BOVERIS, A.; NAVARRO, A. **Brain mitochondrial dysfunction in againg.** IUBMB Life, v. 60, n. 5, p. 308-314, 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, M D; CHRISTENSEN, M D; ROTHSTEIN, G. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** Journal of Investigative Dermatology, v. 78, p. 206-209, 1982.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste – Especialmente do Ceará.** Editora Universitária da UFRN, 4.ed., Natal-RN, 1960.

BRASIL. MINISTÉRIO DO ORÇAMENTO, PLANEJAMENTO E GESTÃO. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAGFIA E ESTATÍSTICA. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/contagem2007/contagem_final/tabela1_1.pdf. Acessado em: 20 de abril de 2009.

BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; POSADAS, I.; YU, J.; PARENTE, L.; SESSA, W. C.; IGNARRO, L.J.; CIRINO, G. **Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation *in vivo*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, p. 904-908, 2005.

CAHILL, C. M.; CODERRE, T. J. **Attenuation of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain after intrathecal pre- or post-treatment with a neurokinin-1 antagonist.** Pain, v. 95, p. 277-285, 2002.

CAMARGO, E. A.; FERREIRA, T.; RIBELA, M. T.; NUCCI, G.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E. **Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A2.** *Pancreas*, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2008.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. **Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 314-319, 2008.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAL, H.; ROSS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSLK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. **COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure and expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHENG, Y.; MA, L. Y.; MIAO, J. H.; XU, X. D.; YUAN, J. Q.; YANG, J. S. **A new cassane diterpenoid lactone from the seed of *Caesalpinia minax*”.** *Chinese Chemical Letters*, v. 20, p. 444-446, 2009.

CHEN, H. J.; WU, C. F.; HUANG, J. L. **Measurement of urinary excretion of 5-hydroxymethyluracil in human by GC/NICI/MS: Correlation with cigarette smoking, urinary TBARS and etheno DNA adduct.** *Toxicology Letters*, v. 155, p. 4093-4102, 2005.

CICALA, C.; MORELLO, S.; ALFIERI, A.; VELLECO, V.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G. **Haemostatic imbalance following carrageenan-induced rat paw oedema.** *European Journal of Pharmacology*, v. 577, p. 156-161, 2007.

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

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. **Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.** *Journal of Pathology*, v. 104, p. 15-29, 1971.

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

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. **The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats**. Pain, v. 4, p. 161-174, 1977.

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

DUHAM, N. W.; MIYA, T. S. **A note on a simple apparatus for detecting neurological déficit in rats and mice**. Journal of American Pharmacology Association, v. 46, p. 208-209, 1957.

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

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN. Methods in Enzymology, L. Packer, ed, v. 186, p. 407-421, 1990.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B. **Glutamate spinal retrograde sensitization of primary sensory neurons associated with nociception**. Neuropharmacology, v. 33, p. 1479, 1995.

FORMELA, L. J.; GALLOWAY, S. W.; KINGSNORTH, A. N. **Inflammatory mediators in acute pancreatitis**. Brazilian Journal of Surgery, v. 82, p. 6-13, 1995.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; VIAL CORRÊA C. B.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R. dos; TOMASSINI, T. **Fitoterápicos**. In.: WORKSHOP BIODIVERSIDADE, 1996. Perspectivas e oportunidades tecnológicas. Campinas, Fundação André Tosselo - FAT, BDT, [1996]. (Disponível na:

GAZZANEO, L. R. S.; LUCENA, R. F. P.; ALBUQUERQUE, U. P. **knowledge and use of medicinal plants by local specialists in na region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil).** Journal of Ethnobiology, v. 1, n. 9, P. 1-8, 2005.

GELAIN, D. P.; SOUZA, L. F.; MOREIRA, J. C. F.; BERNARD, E. A. **Extracellular inosine is modulated by H₂O₂ and protects Sertoli cells against lipoperoxidation and cellular injury.** Free Radical Research, v. 38, n. 1, p. 37-47, 2004.

GHANSANFARI, G.; MINAIE, B.; YASA, N.; LEILU, A. N.; AZADEH, M. **Biochemical and histopathological evidences for beneficial effects of *Satureja khuzestanica* Jamzad essential oil on the muose model of inflammatory bowel diseases.** Toxicology Mechanism and Methods, v. 16, p. 365-372, 2006.

GIERSE, J.; NICKOLS, M.; LEAHY, K.; WARNER, J.; ZHANG, Y.; CORTES-BURGOS, L.; CARTER, J.; SEIBERT, K.; MASFERRER, J. **Evaluation of COX-1/COX-2 selectivity and potency of a new class of COX-2 inhibitors.** European Journal of Pharmacology, v.588, p.93-98, 2008.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.; VAN DEN BERG, C. **Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil.** Megadiversidade, v. 1, n. 1, 2005.

GUO, Y.; MOCHIZUKI, T.; MORTI, E.; KITAMURA, Y.; MAEYAMA, K. **Role of mast cell histamine in the formation of rat paw edema: A microdialysis study.** European Journal of Pharmacology, v. 331, p. 237-243, 1997.

HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implication for antioxidant treatment.** Drugs Aging, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Measurement of reactive species.** In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Ed. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, p. 268-337, 2007.

HALLIWELL, B.; HOULT, J. R. S.; BLAKE, D. R. **Oxidants, inflammation and anti-inflammatory drugs.** *FASEB Journal*, n. 2, p. 501-518, 1988.

HARRIS, J.M., SPENCER, P.S.J. **A modified plethysmographic apparatus for recording volume changes in rat paw.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 14, p. 464-466, 1962.

HERWIG, R; GLODNY, B.; KÜHLE, C.; SCHLÜTER, B.; BRINKMAN, O. A.; STRASSER, H.; SENNINGER, N.; WINDE, G. **Early identification of peritonitis by peritoneal cytokine measurement.** *Disease Colon Rectum*, v. 45, n. 4, p. 514-521, 2002.

HONG, C. H.; HUR, S. K.; OH, O. J.; KIM, S. S.; NAM, K. A.; LEE, S. K. **Evaluation of natural products on inhibition of inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) in cultured mouse macrophage cells.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, p. 153-159, 2002.

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

IASP. **Culture and Pain.** *Pain – Clinical Updates*, v. X, n. 5, 2002.

JACOB, J. J. C.; RAMABADRAN, K. **Enhancement of a nociceptive reaction by opiate antagonists in mice.** *British Journal of Pharmacology*, v. 64, p. 91-98, 1978.

JACOB, J. J. C.; TREMBLAY, E. C.; COIOMEEL, M. C. **Facilitation the reactions nociceptives by naloxone in mice and rats.** *Psychopharmacology (berl.)*, v. 37, p. 213-223, 1974.

JAISHREE, V.; BADANI, S.; KUMAR, M. R.; TAMIZHMANI, T. **Antinociceptive activity of swertiamarin isolated from *Enicostemma axillare***. Phytomedicine, v. 16, p. 227-232, 2009.

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

JUN, H.; XIAOLING, Y.; WEI, W.; HAO, W. LEI, H.; LIJUN, D. **Antioxidant activity in vitro of three constituents from *Caesalpinia sappan* L.** Tsinghua Science and Technology, v. 13, n. 4, p. 474-479, 2008.

KASUGA, K.; YANG, R.; PORTER, T. F.; AGRAWAL, N.; PETASIS, N. A.; IRIMIA, D.; TONER, M.; SERHAN, C. H. **Rapid appearance of resolvins precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution**. The Journal of Immunology, v. 181, p. 8677-8687, 2010.

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

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. **Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms**. Journal of Pharmacological Sciences, v. 96, p. 229-245, 2004.

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

KOSTER, R.; ANDERSON, N.; DEBBER, E.J. **Acetic acid for analgesic screening**. Federation Proceedings, v. 18, p. 418-420, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A. R.; FAUSTO, N. **Inflamação aguda e crônica**. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2005, cap. 2, p. 65-66.

LAZZARINI, R.; MAIORKA, P. C.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. **Diazepam effects on carragenan-induced inflammatory paw edema in rats: Role of nitric oxid.** Life Sciences, v. 78, p. 3027-3034, 2006.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: WALL PD, MELZACK, R. (eds) **Textbook of Pain**. New York, Churchill Livingstone, p. 59-84, 1999.

LIEBMANN, C.; OFFERMANN, S.; SPICHER, K.; HINSCH, K. D.; SCHNITTNER, M.; MORGAT, J. L.; REISSMANN, S.; SCHULTZ, G.; ROSENTHAL, W. **A high-affinity bradykinin receptor in membranes from rat myometrium is coupled to pertussis toxin-sensitive G-proteins of the G_i family.** Biochemical and Biophysical Research. Community, v. 167, p. 910-917, 1990.

LIMA, E. SS.; ABDALLA, D. S. P. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 37, n. 3, 2001.

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, v. 8, p. 127-136, 2007.

LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. **The role of inflammation in CNS injury and disease.** British Journal of Pharmacology, v. 147, p. 232-240, 2006.

LUCENA, G. M. R. S.; GADOTTI, V. M.; MAFFI, L. C.; SILVA, G. S.; AZEVEDO, M. S.; SANTOS, A. R. S. **Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl.** Journal of Ethnopharmacology, v. 112, p. 19-15, 2007.

MANDELKER, L. **Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction.** Veterinary Clinical American Small Animals, v. 38, n. 1, p. 1-30, 2008.

MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; CHAIN, B. **Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages.** European Journal of Pharmacology, v. 25, p. 947-951, 1995.

MARTÍNEZ, M. J.; BETANCOURT, J.; ALONSO-GONZALEZ, N.; JAUREGUI, A. **Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 52, p. 171–174, 1996.

MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 2. ed. Fortaleza: UFC. 1997a.

MATOS, J. M. D. **As Plantas que Curam Também Matam.** UFC: Fortaleza. 1997b.

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

MEINI, S.; CUCCHI, P.; CATALANI, C.; BELLUCI, F.; GIULIANI, S.; SANTICIOLI, P.; MAGGI, C. A. **Pharmacological characterization of the bradykinin B₂ receptor antagonist MEN16132 in rat *in vitro* bioassays.** European Journal of Pharmacology, v. 615, p. 10-16, 2009.

MENDES, C. C.; BAHIA, M. V.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. **Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*.** Fitoterapia, v. 71, p. 205-207, 2000.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; THOMAZZI, S. M. **Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves.** Journal of Ethnopharmacology, v. 129, p. 391-397, 2010.

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

MILLIGAN, E. D.; O'CONNOR, K. A.; NGUYEN, K. T.; ARMSTRONG, C. B.; TWINING, C.; GAYKEMA, R. P.; HOLGUIN, A.; MARTIN, D. MAIER, S. F.; WATKINS, L. R. **intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp-120 induces enhanced pain state mediated by spinal cord proinflammatory cytokines.** Journal of Neuroscience, v. 21, p. 2808-2819, 2001.

MONTEIRO, D. A. **Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR ®) sobre biomarcadores de estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta.** São Carlos, 2006. 162 f. Dissertação (Mestrado em fisiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos.

MONTEIRO, J. M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAUJO, E. L.; ALBUQUERQUE, V. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. Revista Árvore, v. 29, n. 6, p. 999-1005. 2005.

MORENO, J. J. **Antiinflammins: endogenous nonapeptides with regulatory effect on inflammation.** General Pharmacology, v. 28, n. 1, p. 23-36, 1997.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. **Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan induced inflammation.** British Journal of Pharmacology, v. 128, p. 853-859, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. **Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system.** Free Radical Biology & Medicine, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OHTA, Y.; KONGO, M.; KISHIKAWA, T. **Melatonin exerts a therapeutic effect on cholestatic liver injury in rats with bile duct ligation.** Journal of Pineal Research, v. 34, p. 119-126, 2003.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. **Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Leguminosae-Mimosoidae*).** Revista Brasileira de Biociências, v. 5, p. 384-386, 2007.

OLIVEIRA, F. M. **Isolamento e caracterização de constituintes químicos de raízes de *Esenbeckia grandiflora* (Rutaceae).** Dissertação de mestrado. DQ, UFAL. 1995.

OMOTE, K.; HAZAMA, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAKAYAKA, Y.; TORIYABE, M. **Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation.** Brain Research, v. 912, p. 171-175, 2001.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** Physiology Research, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PATTO, R. J.; VINAYEK R.; JENSEN R. T.; GARDNER J. D. **Carbachol does not down-regulate substance P receptors in pancreatic acini.** Pancreas, v. 7, p. 447-52, 1992.

PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; RODRIGUES, M.; MORAIS, E. K. L.; MACIEL, M. A. M. **Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 17, n. 4, p. 521-528, 2007.

PETERS-GOLDEN, M; CANETTI, C; MANCUSO, P; COFFEY, M. J. **Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses.** Journal of Immunology; v. 174, n. 2, p. 589-594, 2005.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZZA, R. **Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.

PORTER, N. A.; CALDWELL, S. E.; MILLS, K. A. **Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids.** Lipids, v. 30, n. 4, p. 277-290, 1995.

QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; DIAS, T. L. M. F.; SOUZA, E. T.; MATTA, C. B. B.; AQUINO, A. B.; SILVA, L. N. A. C.; SILVA, D. J. C.; MELLA, E. A. C.; AGRA, M. F.; FILHO, J. M. B.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; SANTOS, B. V. O. ALEXANDRE-MOREIRA,

M. S. **The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth (Fabaceae).** Journal of Ethnopharmacology, v. 128, p. 377-383, 2010.

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

REDDY, C. S. S. S.; SUBRAMANYAM, M. V. V.; VANI, R.; DEVI, S. A. ***In vitro* models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements.** Toxicology *in vitro*, v. 21, p. 1355-1364, 2007.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. **Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice.** European Journal of Pharmacology, v. 387, p. 111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. **Nociception, pain and antinociception: current conceptions,** v. 60, p. 404-415, 2001.

ROCHA, F. F.; NEVES, M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, M. S. P.; CORTES, W. S.; VANDERLINDE, F. A. **Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabior* Lanj. (Euphorbiaceae).** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 18, n. 3, p. 344-349, 2008.

ROKYTA, R.; HOLECEK, V.; PEKARKOVA, I.; KREJCOVA, J.; RACEK, J. **Free radicals after painful stimulation are influenced by antioxidants and analgesics.** Neuroendocrinology Letters, v. 24, p. 304-309, 2003.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. **Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation.** British Journal of Pharmacology, v. 118, p. 829-838, 1996.

SAMAD, T. A.; MOORE, K. A.; SAPIRSTEIN, A.; BILLET, S.; ALCHORNE, A.; POOLE, S.; BONVENTRE, J. V.; WOOLF, C. J. **Interleukin-1beta-mediated induction of COX-2**

in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. Nature, v. 410, p. 471-475, 2001.

SAUTEBIN, L.; IALENTI, A.; IANARO, A.; DI ROSA, M. **Modulation by nitric oxide of prostaglandin biosynthesis in the rat.** British Journal of Pharmacology, v. 114, p. 323-328, 1995.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. **Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico.** Revista Brasileira de Medicina Esportiva, v. 10, n. 4, p. 308-313, 2004.

SCHOLMERICH, J. **Interleukins in acute pancreatitis.** Scandinavian Journal of Gastroenterology Supplement, v. 219, p. 37-42, 1996.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. **Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

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

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; SINGH, S.; MEHTA, P. VYAS, S. P. **Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds.** Food and Chemical Toxicology, v. 47, p. 1848-1851, 2009.

SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, C. T.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, C. H.; MARÇAL, R. M. ANTOPNIOLLI, A. R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. Ex Benth.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 475-479, 2006.

SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P. **Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - *Caesalpinaceae*) e de juazeiro (*Zizyphus***

joazeiro Mart. - Rhamnaceae). Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 20, n. 2, p. 263-269, 1998.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. **Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, M. J. N.; NANJAN, M. J.; SURESH, B. **Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root**. Journal of Ethnopharmacology, v. 113, p. 284-291, 2007.

St-PIERRE, J.; BUCKINGHAN, J. S.; ROEBUCK, S. J.; BRAND, M. S. **Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain**. Journal of Biology and Chemistry, v. 277, p. 44784-44790, 2002.

SWEITZER, S.; MARTIN, D; DELEO, J. A. **Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibitis an anti-allodynic action in a rat model of neurophatic pain**. Neuroscience, v. 103, p. 529-539, 2001.

TAYLOR, K. R.; GALLO, R. L. FASEB Journal, v. 20, p. 9-22, 2006.

TILL, J. W. O.; VEEN, S. Q.; BROEDER, V.; BRESSER, P.; LUTTER, R.; OUT, T. A.; SCHULTZ, M. J.; GOUMA, D. J.; BOERMEESTER, M. A. **Compartmental apoptosis and neutrophil acumulation in severe peritonitis**. Journal of Surgical Research, article in press, p. 1-8, 2010.

TORNOS, M. P.; SÁENZ, M. T.; GARCIA, M. D.; FERNÁNDEZ, M. A. **Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachy***. Journal of Ethnopharmacology, v. 68, p. 229-234, 1999.

UMBUZEIRO: **Checklist das plantas do nordeste. *Caesalpinia pyramidalis*, versão I – 2005**. Disponível na internet: <http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/pnechk/taxa/1329/html>. Acessado em 15 jan/10.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIC, M. T. D.; MILAN, M.; TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 32, n. 3, p. 3-41, 2007.

VEEN, B. V. D.; WINTHER, M. P. J.; HEERINGA, P. **Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease.** Antioxidants and Signaling, v. 11, p. 2899-2937, 2009.

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

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

WEISS, S. T. **Tissue destruction by neutrophils.** New England Journal of Medicine, n. 320, p. 365-376, 1989.

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

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

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, C.W. **Carrageenan-induced oedema in hind paw of rats-an assay for anti-inflammatory drugs.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, v. 111, p. 544-547, 1962.

WITKO-SARSAT, V.; DESCAMPS-LATSCHA, B. **Neutrophil – derived oxidants and proteinases in immunomodulatory mediators in inflammation.** Mediators of Inflammation, v. 3, p. 257-273, 1994.

WOOLFE, C. A.; MACDONALD, A. D. **The evaluation of the analgesic action of pentidine hydrochloride (Demerol).** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 80, p. 300, 1944.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. **Studies on direct spinal action of narcotics in production of analgesia in rats.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 202, p. 963-965, 1977.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Revista Química Nova, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAKARIA, Z. A.; WEN, L. Y.; RAHMAN, N. I. A.; AYUB, A. H. A.; SULAIMAN, M. R.; GOPALAN, H. K. **Antinociceptive, anti-inflammatory and antypiretic properties of the aqueous extract of *Bauhinia purpurea* leaves in experimental animals.** Medical Principles and Practice, v. 16, p. 443-449, 2007.

ANEXO I



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

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Estudos farmacológico e bioquímico do extrato etanólico e partições da entrecasca da *Caesalpinia pyramidalis*", sob coordenação da Profa. Dra. Sara Maria Thomazzi (protocolo CEPA 05/2009), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 07/05/2009.

São Cristóvão, 15 de maio de 2009

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

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

ANEXO II

Mensagem original

De: Cid AimbirĂŠ de Moraes Santos <revista@sbfgnosia.org.br>

Para: Sara Maria Thomazzi <sarathomazzi@uol.com.br>

Assunto: [RBFAR] Submission Acknowledgement

Enviada: 04/08/2010 15:35

Sara Maria Thomazzi:

Thank you for submitting the manuscript, "RBFAR-446 - Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* Tul., Fabaceae, in rodents" to Revista Brasileira de Farmacognosia. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/rbfar/author/submission/37532>

Username: sarathomazzi

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering this journal as a venue for your work.

Cid AimbirĂŠ de Moraes Santos
Revista Brasileira de Farmacognosia

Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caesalpinia pyramidalis* Tul., Fabaceae, in rodents

Cliomar A. Santos,¹ Ailane M. P. R. Passos,¹ Enilton A. Camargo,¹ Charles S. Estevam,² Sara M. Thomazzi^{*,1}

¹Laboratório de Farmacologia da Inflamação, ²Laboratório de Bioquímica, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

*Author for correspondence: Sara Maria Thomazzi, PhD, Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon S/N, 49100-000, São Cristóvão (SE), Brasil, Tel.: +55 79 21056640, FAX: +55 79 21056474, E-mail: sara^{thomazzi@ufs.br}

RESUMO: “Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da *Caesalpinia pyramidalis* Tul., Fabaceae, em roedores”. A *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) é utilizada na medicina popular em processos inflamatórios. Para avaliar as atividades analgésica e anti-inflamatória desta planta, estudos foram realizados com o extrato etanólico (EE) da entrecasca. O tratamento oral único dos animais com o EE inibiu o efeito do ácido acético (100, 200 e 400 mg/kg, $p < 0,001$), reduziu o efeito da formalina em ambas as fases (100, 200 e 400 mg/kg, $p < 0,001$) e o tempo de reação no teste da placa quente (400 mg/kg, $p < 0,05$). A ação antinociceptiva do EE não influenciou significativamente o desempenho dos camundongos no teste de rota rod. A formação de edema e a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzidas pela carragenina foram reduzidas pelo tratamento com o EE

(400 mg/kg, $p < 0,05$). Desta forma, conclui-se que o EE da *C. pyramidalis* apresenta atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, suportando seu uso popular no tratamento de doenças inflamatórias.

Unitermos: Anti-inflamatória, antinociceptiva, *Caesalpinia pyramidalis*, Fabaceae.

ABSTRACT: *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae) is a plant with anti-inflammatory activity used in folk medicine. In order to evaluate the actions of this plant, studies were performed on antinociceptive and anti-inflammatory activities with the ethanol extract (EE) of inner bark. Oral treatment with the EE elicited inhibitory activity on acetic acid effect (100, 200, and 400 mg/kg, $p < 0.001$), it reduced the formalin effect at both the phases (100, 200, and 400 mg/kg, $p < 0.001$), and increase the reaction time on hot-plate test (400 mg/kg, $p < 0.05$). The antinociceptive action of the EE did not significantly influence the performance of mice on the rota rod test. Carrageenan-induced oedema formation and leukocyte migration into peritoneal cavity were reduced with the EE at 400 mg/kg ($p < 0.05$). In conclusion, the EE of *C. pyramidalis* shows antinociceptive and anti-inflammatory activities, supporting the folkloric usage of the plant to treat various inflammatory diseases.

Keywords: Anti-inflammatory, antinociceptive, *Caesalpinia pyramidalis*, Fabaceae.

INTRODUCTION

Inflammation is one of the most important processes involved in the defense of an organism; however, it often progresses to painful or chronically harmful diseases needing pharmacological treatment. Unfortunately, the therapies currently available to treat inflammation and pain are associated with important side effects and low efficacy. There has been a resurgence of interest in herbal medicines in Western countries (Phillipson & Anderson, 1989) as alternative sources of drugs for often intractable diseases.

Previous studies of species of the genus *Caesalpinia* (Fabaceae) report remarkable biological activities such as antimicrobial (Saeed & Sabir, 2001), antidiabetic (Sharma et al., 1997) (*C. bonducella*), antimalarial (Deharo et al., 2001; Kuria et al., 2001) (*C. volkensii*, *C. pluviosa*), and anti-inflammatory (Hikino et al., 1977; Carvalho et al., 1996) (*C. sappan*, *C. ferrea*).

Caesalpinia pyramidalis Tul. is an endemic tree of northeastern region and one of the predominant species in the “caatinga” vegetation. The plant *C. pyramidalis*, known as “catingueira”, is a medicinal plant species used in folk medicine to cough, bronchitis,

respiratory infection, influenza, asthma, gastritis, colic, fever, heartburn, flatulence, diarrhea, collision, injury, diabetes, stomach ache, and as aphrodisiac and expectorant (Albuquerque et al., 2007).

In this study, we evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract (EE) from *C. pyramidalis* inner bark.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extraction of *C. pyramidalis* inner bark

Inner bark of *C. pyramidalis* was collected in the municipality of Canindé de São Francisco, Sergipe State, Brazil, in September 2008 (09°66'00"S, 37°78'94"W). The plant was authenticated by Professora Ana Paula Prata, Department of Biology, Federal University of Sergipe, and a voucher specimen deposited in the Federal University of Sergipe Herbarium (Av. Marechal Rondon S/N, São Cristóvão-SE 49100-000, Brazil, number ASE 13.164). The dried inner bark at 40°C in a forced air oven for 2 days was powdered (2.840 g), extracted by maceration at room temperature with 90% ethanol for 5 days. The extract was filtered in vacuum and the solvent was removed using a rotary evaporator (45°C). The percentage of yield of the EE was 2.6% (73.8 g).

Phytochemical screening

The methods of Matos (1997) were used to screen the EE of *C. pyramidalis* inner bark used in this study for its chemical constituents.

Animals

Wistar rats (120-180 g) and Swiss mice (20-30 g) of both sexes, young adults, were obtained from the Central Biotery of the Federal University of Sergipe (São Cristóvão, Brazil). Animals were maintained at controlled room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to food (Purina®) and water, under a 12:12 h light/dark cycle. All the experimental procedures were carried out during the light period of the day (08:00 a.m. to 05:00 p.m.) and complied with the guidelines on animal care of the Federal University of Sergipe Ethics Committee for Animal Use in Research (CEPA/UFS 05/09).

Acetic acid-induced abdominal writhes

Abdominal writhes were induced by intraperitoneal (*i.p.*) injection in mice of acetic acid (0.6%, 0.1 mL/10 g) (Koster et al., 1959). Mice were pre-treated orally (*per os*, *p.o.*) with *C. pyramidalis* EE (100-400 mg/kg), vehicle (0.2% Tween 80, 0.1 mL/10 g), or acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg), 60 min before initiating algescic stimulation ($n = 6/\text{group}$). The

abdominal writhes were observed for a period of 20 min, starting 5 min after injection of the nociceptive agent.

Formalin test

The formalin test was applied according to the method of Hunskaar & Hole (1987). Mice were pre-treated with *C. pyramidalis* EE (100-400 mg/kg, *p.o.*, 60 min beforehand), vehicle (0.2% Tween 80, *p.o.*, 60 min beforehand), morphine (10 mg/kg, *i.p.*, 30 min beforehand), or ASA (300 mg/kg, *p.o.*, 60 min beforehand), before intraplantar injection of 2% formalin solution (20 μ L) into the right hindpaw of the animal ($n = 6$ /group). The time that the animal spent licking or biting its paw was measured during the first-phase (0-5 min) and the second-phase (15-30 min) of the test.

Hot-plate test

Mice were pre-treated with *C. pyramidalis* EE (100-400 mg/kg, *p.o.*), vehicle (0.2% Tween 80, *p.o.*), or morphine (3 mg/kg, *i.p.*), and after 30 min they were placed on a metallic plate warmed to $55 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ($n = 6$ /group). Another set of experiments, naloxone (5 mg/kg, *i.p.*) was injected 30 min prior of the EE (400 mg/kg) or morphine (3 mg/kg) ($n = 6$ /group). The time elapsed until the appearance of reactions (latency, in *s*) to the thermal stimulus, such as lifting or licking of the paws was recorded as an index of nociception (Woolfe & Macdonald, 1944). Measurements were performed at time 0, 30, 60, 90, and 120 min after the first thermal stimulus. In order to avoid damage to the animal's paws the maximal time standing on the plate was limited to 30 s.

Motor function assay: rota rod

To evaluate the possible non-specific muscle-relaxant or sedative effects mice were submitted to the rota rod task (Duham & Miya, 1957). Rota rod apparatus (AVS, Brazil) consisted of a bar with a diameter of 3 cm, subdivided into five compartments. Animals were treated with EE (100-400 mg/kg, *v.o.*), vehicle (0.2% Tween 80, *p.o.*), or diazepam (1.5 mg/kg, *i.p.*) and 60 min after were placed on a rotating rod (7 rpm, $n = 6$ /group). The latency to falling was measured up to 180 s. The results are expressed as the average time (s) the animals remained on the rota rod.

Measurement of paw oedema in rats

The anti-inflammatory activity was studied using the paw oedema model induced by carrageenan (1%, 0.1 mL), administrated into the subplantar region of the right hindpaw of the rat (Winter et al., 1962). *C. pyramidalis* EE (100-400 mg/kg, *p.o.*), dexamethasone (2 mg/kg, *s.c.*), or vehicle (0.2% Tween 80, *p.o.*) were administrated 1 h before the oedematogenic agent ($n = 6$ /group). Paw oedema was measured plethysmographically (model

7150, Ugo Basile, Varese, Italy), at 1, 2, 3, and 4 h after the carrageenan. The data obtained were expressed in mL. The percentage inhibition was calculated based on the area under the time-course curves (AUC_{0-4h}).

Myeloperoxidase (MPO) activity was measured in samples obtained from animals of paw oedema, which were homogenized in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0, containing 0.5% hexadecyl-trimethylammonium bromide (Bradley et al., 1982). These homogenates were incubated for 2 h, 60°C, to inactivation of endogenous catalase. The supernatants were added in a solution of *o*-dianisidine dihydrochloride (0.167 mg/mL, in 50 mM phosphate buffer) containing 0.005% H₂O₂. The changes at 460 nm were measured with a microplate reader (Labsystem Multiskan). The results were expressed as units MPO(UMPO)/mg tissue, where one UMPO was defined as the amount of enzyme that degrades 1 µmol of H₂O₂/min producing a change of 0.0113 units of absorbance.

Leukocyte migration into the peritoneal cavity in mice

The leukocyte migration was induced by injection of carrageenan (1%, 250 µL, *i.p.*) into the peritoneal cavity ($n = 6/\text{group}$) 1 h after administration of the EE (100-400 mg/kg, *p.o.*), vehicle (0.2% Tween 80, *p.o.*), or dexamethasone (2 mg/kg, *s.c.*) as previously described by Mendes et al. (2010). Mice were euthanized 4 h after carrageenan injection. Shortly after, saline containing EDTA (1 mM, 3 mL) was injected into the peritoneal cavity. Total cells were counted in a Neubauer chamber, and cytopspin preparations were stained with May-Grunwald-Giemsa for the differential leukocyte counts. The results were expressed as the number of leukocytes/mL.

Statistical analysis

The results are presented as the mean $\pm$ s.e.m. of n animals per group. Statistical evaluation of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. P values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Phytochemical screening

Phytochemical screening showed that the EE of *C. pyramidalis* inner bark contain flavonoids, phenols, saponins, steroids, tannins, and triterpenes.

Acetic acid-induced writhing in mice

The writhes evoked by injection of acetic acid were markedly reduced by the pre-treatment with *C. pyramidalis* EE at 100, 200, and 400 mg/kg ($p < 0.001$, Table 1). ASA (300 mg/kg)

exhibited significant inhibition ($p < 0.001$) of the control writhes in the acetic acid-induced writhing (Table 1). INSERT TABLE 1

Formalin reaction time in mice

The intraplantar injection of formalin solution produced nociception on both the first- and second-phases (105.2 ± 2.7 and 121.8 ± 5.6 s, respectively, Fig. 1). *C. pyramidalis* EE produced marked inhibition on injection of formalin against the neurogenic (45.5, 31.9, and 42.0% at 100, 200, and 400 mg/kg, respectively, $p < 0.001$) and inflammatory (92.8, 81.0, and 93.0% at 100, 200, and 400 mg/kg, respectively, $p < 0.001$) pains (Fig. 1). Similarly, morphine (10 mg/kg) caused significant inhibition of 75.9 and 96.3% on the first- and second-phases of formalin-induced nociception, respectively ($p < 0.001$, Fig. 2). ASA (300 mg/kg) caused inhibition of 90.6% on second-phase of formalin-induced nociception ($p < 0.001$, Fig. 1). INSERT FIGURE 1

Hot-plate reaction time in mice

The EE of *C. pyramidalis* caused a significant increase in the pain latency in the hot-plate test (55°C) at all analyzed periods at 400 mg/kg ($p < 0.05$, Table 2). Similarly, morphine (3 mg/kg) caused a significant and marked increase in the reaction time of mice ($p < 0.05$, Table 2). Naloxone (5 mg/kg) significantly prevents the antinociception caused by both *C. pyramidalis* EE (400 mg/kg) and morphine (3 mg/kg) at all periods of observation ($p < 0.05$, Table 2). INSERT TABLE 2

Motor performance

In the rota rod test, EE-treated mice did not show any significant motor performance alterations at 100, 200, or 400 mg/kg (180.0 ± 0.0 , 180.0 ± 0.0 , and 180.0 ± 0.0 s, respectively) when compared to control mice (180.0 ± 0.0 s). As expected, injection of the diazepam (1.5 mg/kg) reduced the time of mice on the rota rod after the treatment (31.2 ± 3.4 s, $p < 0.001$).

Carrageenan-induced paw oedema in rats

As observed in Figure 2, the single oral treatment of rats with *C. pyramidalis* EE at 400 mg/kg was capable of reducing ($p < 0.05$) the oedema formation induced by carrageenan, an effect observed at 2, 3, and 4 h after the phlogistic agent. Likewise, dexamethasone (2 mg/kg) inhibited ($p < 0.01$) the oedematogenic response evoked by carrageenan in rats, at 2, 3, and 4 h (Fig. 2).

Based on $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ values, the EE at 400 mg/kg caused 41.2% ($p < 0.05$) of inhibition on the oedema response as compared to carrageenan-treated group (4.61 ± 0.72 mL x h). Dexamethasone (2 mg/kg) caused an inhibition of 54.4% ($p < 0.001$). INSERT FIGURE 2

C. pyramidalis EE (400 mg/kg) produced marked inhibition ($p < 0.05$) on carrageenan-induced MPO activity in paw of rats as compared to control (4.48 ± 0.54 and 7.12 ± 0.94 UMPO/mg tissue, respectively). Similarly, dexamethasone (2 mg/kg) caused significant inhibition on carrageenan-induced MPO activity (2.61 ± 0.33 UMPO/mg tissue, $p < 0.001$).

Carrageenan-induced peritonitis in mice

The carrageenan injection in control animals induced leukocyte migration into the peritoneal cavity 4 h after stimulus of 7.22 ± 0.99 leukocytes $\times 10^6/\text{mL}$. *C. pyramidalis* EE significantly inhibited the carrageenan-induced response at 400 mg/kg (58.4%, $p < 0.01$). The dexamethasone (2 mg/kg) inhibited (90.6%, $p < 0.001$) the carrageenan-induced leukocyte migration.

The PMN migration evoked by carrageenan (5.56 ± 0.22 PMN $\times 10^6/\text{mL}$) was reduced by the EE in 42.6% and 80.2% ($p < 0.001$) at 200 and 400 mg/kg, respectively (Fig. 3). Dexamethasone (2 mg/kg) exhibited significant inhibition (95.7%, $p < 0.001$) of the control PMN migration (Fig. 3).

INSERT FIGURE 3

DISCUSSION

This study evaluated the effects of *C. pyramidalis* EE, using several *in vivo* models of nociception and inflammation in rodents. Our data revealed that *C. pyramidalis* extract significantly diminished the nociceptive alterations in acute models of pain and inflammation.

In the abdominal constriction assay, acetic acid acts indirectly causing the release of nociception endogenous mediators, such as bradykinin, serotonin (5-HT), histamine, sympathomimetic amines, prostaglandins (PG), and pro-inflammatory cytokines (Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001). Acetic acid can also directly activate non-selective cation channels located at primary afferent pathways (Julius & Basbaum, 2001). This nociceptive effect can be prevented by non-steroidal anti-inflammatory drugs, opioids and analgesics with central actions (Reichert et al., 2001). Our results demonstrated that the EE was able to significantly diminish and dose related the abdominal constriction induced by acetic acid, probably by interfering with inflammatory components.

Also, the formalin-induced nociception model was employed to evaluate the antinociceptive effect of the EE. This test allows evaluating two distinct phases: the first phase, that occurs on the first 5 min after the formalin injection (neurogenic), characterized by the direct stimulation of nociceptors presents on afferent C, and, in part, A δ fibers (glutamate

and substance P release). The second phase of nociception, that occurs between the 15th and 30th minute after formalin injection (inflammatory), is related with the release of pro-inflammatory mediators such as adenosine, bradykinin, histamine, PG, and 5-HT (Reeve & Dickenson, 1995). The treatment with the EE was capable of diminishing the nociceptive response in both phases of formalin-induced nociception. This data allow us to suggest that the supposed anti-inflammatory activity of *C. pyramidalis* could be responsible for the obtained result. However, the inhibition presented in the first phase suggests the interference either on the production or on the release of some neuropeptides.

Another interesting result of the current study was the fact that *C. pyramidalis* EE produced a significant antinociception in a thermal model of nociception. The hot-plate test, at a constant temperature, produces two kinds of behavioural response: paw licking and jumping. Both of these are considered to be supraspinally integrated responses (Chapman et al., 1985). The present results lead to the conclusion that the opioid system is involved. This is drawn from the fact that pre-treatment with naloxone, a non-selective opioid receptor antagonist reversed the antinociceptive effect caused by EE. Although the hot-plate test is commonly used to assess narcotic analgesics, sedatives and muscle relaxants or psychotomimetics have shown activity in this test (Eddy & Leimbach, 1953). The antinociceptive actions of the EE do not seem to be associated with non-specific central actions, as this drug did not influence the performance on the rota rod test.

To complement the results obtained on the second phase of formalin-induced licking response, the EE was tested on models of inflammation (paw oedema and peritonitis) induced by carrageenan.

In model of carrageenan-induced rat paw oedema occurs non-immune reaction, which is used to evaluate anti-inflammatory drugs. The oedema formed is a multi-mediated phenomenon divided in two phases. The first phase (until 2 h after carrageenan injection) is due to liberation of histamine, 5-HT, and bradykinin on paw tissue while second phase (3 and 4 h after carrageenan) is sustained by liberation of PG (Di Rosa, 1972). In this study, *C. pyramidalis* EE was effective in reducing the oedematogenic response evoked by carrageenan between the 2nd and 4th h after the injection. These effects may be related to a reduction on liberation of histamine, 5-HT, bradykinin, or PG on local tissue or due to the blockage of receptors to the different mediators cited before.

The EE significantly decreased the elevated MPO activity, an indicator of neutrophil in inflamed paws, suggesting that inhibition of neutrophil infiltration may be another mechanism by which the EE achieves its anti-inflammatory effect. Considering that injection of

carrageenan is followed by an inflammatory response, accompanied by cell migration and release of inflammatory mediators, it is feasible to believe that the blood–brain-barrier (BBB) has its function altered. It is generally accepted that neutrophils, through the release of cytotoxic enzymes and reactive oxygen species (ROS), contribute to the BBB disruption with consequent exacerbation of inflammatory conditions (Pun et al., 2009). Mitchell et al. (2008) demonstrated that peripheral inflammation elicited by carrageenan injection into the rat paw results in increased MPO activity in the spinal cord, which carry on the expression of some relevant partners of the inflammation.

Using carrageenan as a stimulus, it was possible to produce an acute inflammatory response in the peritoneal cavity of mice, with a large number of leukocytes in the exudates. The EE inhibited PMN migration induced by carrageenan. The action mechanism of carrageenan on peritonitis involves synergism between PG, leukotriene B₄ and other chemostatic agents, which promote an increase of the vasodilatation, exudation and recruitment of leukocytes (Foster et al., 1986).

In summary, the data reported in this work confirmed the traditional anti-inflammatory indications of *C. pyramidalis*. Also, this study demonstrated, for the first time, that *C. pyramidalis* has relevant antinociceptive properties for acute pain-like behavioral animal models. The mechanisms through which *C. pyramidalis* exerts its actions require further study.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). C.A. Santos and A.M.P.R. Passos receiving grants from CNPq.

REFERENCES

- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, Lins Neto EMF, Melo JG, Santos JP 2007. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325-354.
- Bradley PP, Priebat M, Christensen M, Rothstein G 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78: 206-209.

- Carvalho JCT, Teixeira JRM, Souza PJC, Bastos JK, Santos Filho D, Sarti SJ 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J Ethnopharmacol* 53: 175-178.
- Chapman CR, Casey KL, Dubner R, Foley KM, Graceley RH, Reading AE 1985. Pain measurement: an overview. *Pain* 22: 1-31.
- Deharo E, Bourdy G, Quenedo C, Muñoz V, Sauvin MA 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 77: 91-98.
- Di Rosa M 1972. Biological properties of carrageenan. *J Pharmacy Pharmacol* 24, 89-102.
- Duham NW, Miya TS 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46: 208-209.
- Eddy NB, Leimbach D 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 107: 385-393.
- Foster SJ, McCormick ME, Howarth A, Aked D 1986. Leukocyte recruitment in the subcutaneous sponge implant model of acute inflammation in the rat is not mediated by leukotriene B₄. *Biochem Pharmacol* 35: 1709-1717.
- Hikino H, Tagushi T, Fujimura H, Hiramatsu Y 1977. Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood. *Planta Med* 31: 214-220.
- Hunskar S, Hole K 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. [Pain](#) 30: 103-114.
- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-Ishi S 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acetic acid-induced writhing response of mice. *Life Sci* 69: 2911-2919.
- Julius D, Basbaum AI 2001. Molecular mechanism of nociception. *Nature* 413: 203-210.
- Koster R, Anderson N, Debber EJ 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* 18: 418-420.
- Kuria KAM, De Coster S, Muriuki G, Masengo W, Kibwage I, Hoogmartens J, Laekeman GM 2001. Antimalarial activity of *Ajuga remota* Benth (Labiateae) and *Caesalpinia volkensii* Harms (Caesalpinaceae): confirmation of ethnopharmacological use. *J Ethnopharmacol* 74: 141-148.
- Matos FJA 1997. *Introdução a Fitoquímica Experimental*. Fortaleza, Brazil: Edições UFC.
- Mendes SS, Bomfim RR, Jesus HCR, Alves PB, Blank AF, Estevam CS, Antonioli AR, Thomazzi SM 2010. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. *J Ethnopharmacol* 129: 391-397.

- Mitchell K, Yang HY, Tessier PA, Muhly WT, Swaim WD, Szalayova I, Keller JM, Mezey E, Iadarola MJ 2008. Localization of S100A8 and S100A9 expressing neutrophils to spinal cord during peripheral tissue inflammation. *Pain* 134: 216-231.
- Phillipson JD, Anderson LA 1989. Ethnopharmacology and Western Medicine. *J Ethnopharmacol* 25: 61-72.
- [Pun PB](#), [Lu J](#), [Moochhala S](#) 2009. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic Res* 43: 348-364.
- Reeve AJ, Dickenson AH 1995. The roles of spinal adenosine receptors in the control of acute and more persistent nociceptive response of dorsal horn neurons in the anaesthetized rat. *Brit J Pharmacol* 116: 2221-2228.
- Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA 2001. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain* 89: 221-227.
- [Ribeiro RA](#), [Vale ML](#), [Thomazzi SM](#), [Paschoalato AB](#), [Poole S](#), [Ferreira SH](#), [Cunha FQ](#) 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* 387:111-118.
- Saeed MA, Sabir A 2001. [Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella*](#) *Fitoterapia* 72: 807-809.
- Sharma SR, Dwivedi SK, Swarup D 1997. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. *J Ethnopharmacol* 58: 39-44.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 111: 544-547.
- Woolfe G, Macdonald AD 1944. The evaluation of the analgesic action of pentidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80: 300.

FIGURE 1

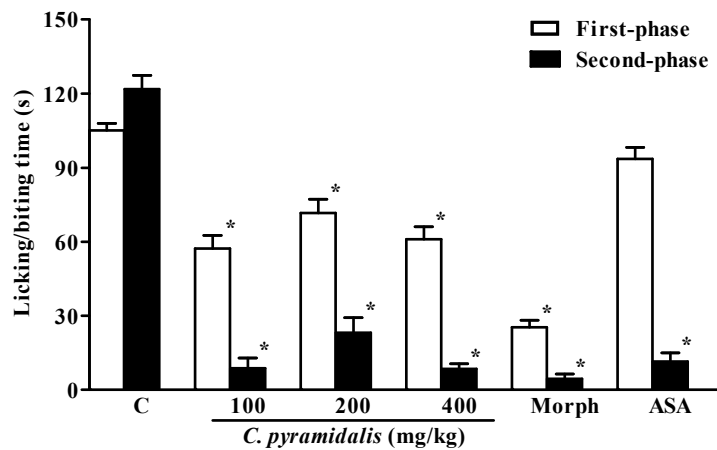


Figure 1. Effect of *C. pyramidalis* EE on formalin-induced nociception. Mice were pre-treated with vehicle (C), morphine (Morph, 10 mg/kg), acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg), or EE (100-400 mg/kg) before formalin injection. * $p < 0.001$ vs. control group ($n = 6$ /group).

FIGURE 2

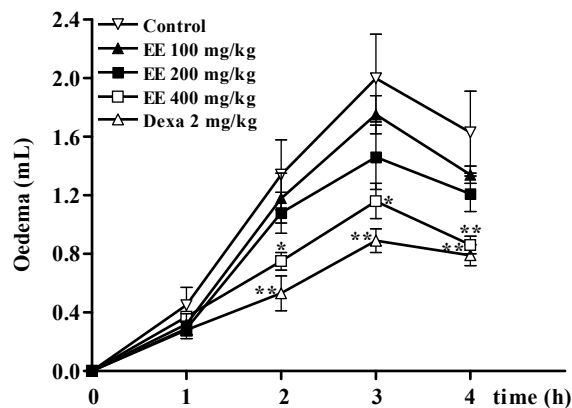


Figure 2. Effect of *C. pyramidalis* EE on paw oedema. Rats were pre-treated with vehicle (control), dexamethasone (Dexa, 2 mg/kg), or EE (100-400 mg/kg) before carrageenan injection. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. control group ($n = 6$ /group).

FIGURE 3

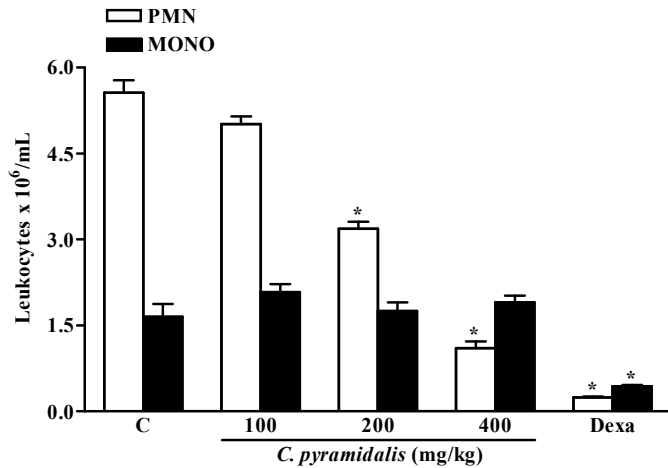


Figure 3. Effect of *C. pyramidalis* EE on leukocyte migration. Mice were pre-treated with vehicle (C), dexamethasone (Dexa, 2 mg/kg), or EE (100-400 mg/kg) before carrageenan-induced peritonitis. * $p < 0.01$ and ** $p < 0.001$ vs. control group ($n = 6/\text{group}$).

TABLE 1. Antinociceptive effect of *C. pyramidalis* EE on acetic acid-induced writhing.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of writhes	Inhibition (%)
Vehicle	--	31.2±0.9	--
EE	100	24.7±0.7 ^a	20.9
	200	18.2±0.3 ^a	41.7
	400	9.5±0.7 ^a	69.5
ASA	300	7.5±0.5 ^a	75.9

^a $p < 0.001$ vs. vehicle ($n = 6/\text{group}$).

TABLE 2. Antinociceptive effect of *C. pyramidalis* EE on hot-plate test.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time after first stimulus (s)				
		0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Vehicle	--	8.2±0.9	10.2±0.5	8.5±0.6	9.8±0.5	8.7±0.8
EE	100	12.3±0.8	13.8±2.2	14.7±1.7	11.7±0.6	10.3±1.1
	200	13.2±1.4	14.0±2.0	13.8±1.4	11.5±1.0	11.2±0.7
	400	12.5±1.0 ^a	17.5±2.0 ^a	18.0±2.4 ^a	18.2±1.8 ^a	14.8±0.4 ^a
Morphine	3	30.0±0.0 ^a	30.0±0.0 ^a	29.0±0.7 ^a	28.7±0.6 ^a	30.0±0.0 ^a
Naloxone + Morphine	5 + 3	11.4±4.4 ^b	11.6±5.8 ^b	10.5±4.9 ^b	9.7±6.2 ^b	8.5±2.9 ^b
Naloxone + EE	5 + 400	6.7±0.5 ^c	10.7±0.8 ^c	8.7±1.4 ^c	11.3±1.6 ^c	9.0±1.5 ^c

$p < 0.05$ vs. ^avehicle, ^bmorphine, and ^cEE (400 mg/kg) ($n = 6/\text{group}$).