



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

MARCOS GUILHERME DE SOUSA GOUVEIA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *COMBRETUM DUARTEANUM* CAMBESS
(COMBRETACEAE)**

**ARACAJU
2011**

MARCOS GUILHERME DE SOUSA GOUVEIA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *COMBRETUM DUARTEANUM* CAMBESS
(COMBRETACEAE)**

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

Orientador: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior

**ARACAJU
2011**

MARCOS GUILHERME DE SOUSA GOUVEIA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *COMBRETUM DUARTEANUM* CAMBESS
(COMBRETACEAE)**

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

APROVADA EM: 31/03/2011

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (UFS)

1º EXAMINADOR: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
(UNIVASF)

2º EXAMINADOR: Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim (UFS)

PARECER

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

G719e Gouveia, Marcos Guilherme de Sousa
Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante do extrato
etanólico das folhas de Combretum Duarteanum Cambess
(Combretaceae) / Marcos Guilherme de Sousa Gouveia. – Aracaju,
2011.
000 f.

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

Orientador (a): Prof. Dr. Lucindo José Quitanas Júnior.

1. Combretum Duarteanum (Combretaceae) 2. Atividade
antinociceptiva 3. Atividade antioxidante 4. Atividade anti-
inflamatória 5. Botânica sistemática 6. Plantas medicinais 7.
Farmacologia I. Título.

CDU 582.776.7:615

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Assis Gouveia (*in memoriam*) e Mércia Gouveia, que sempre acreditaram em minha capacidade de lutar e vencer desafios.

Aos meus avós, Hilda, Pedro e Iracy (*in memoriam*), por representarem o início de um família com base CRISTÃ.

As minhas adoradas filhas Sara e Laís, que são a razão da minha vida e o motivo maior das minhas lutas e vitórias.

À minha amada esposa Melinha, por todo apoio, cumplicidade, respeito e amor a mim dedicados.

A quem devo todo estímulo, compreensão e tolerância, para alcançar este objetivo.

Sem o seu carinho e amor não teria vencido, muito obrigado.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me dado saúde, sabedoria e o amor incondicional de todos os meus familiares, especialmente, os meus pais Francisco de Assis Gouveia (*in memorian*) e Mércia de Souza Gouveia, à minha esposa Maria do Carmo Queiroz Gouveia (Melinha) e minhas filhas Sara e Laís Queiroz Gouveia.

Ao Professor Doutor Lucindo José Quintans Júnior, orientador e amigo, que com sua valorosa contribuição, abriu as portas do conhecimento científico e cujos ensinamentos possibilitaram-me a conclusão deste estudo.

Aos colegas do LAPEC, Marília, Geovana e todos que compõem aquela casa da ciência, e especialmente Adriana Gibara e Aldirene pela generosidade e contribuição valiosa durante a qualificação desta dissertação.

Aos amigos do Mestrado, por dividirem os conhecimentos científicos e pelo companheirismo em momentos únicos, que sempre estarão em minhas lembranças.

À amiga Rossana Cahino, pela contribuição e estímulo.

A todos que fazem o Núcleo de Pós Graduação em Medicina - UFS, especialmente a Martha Suzana e Jolinda.

Aos meus familiares, Irmãos e Irmãs, Cunhados e Cunhadas, Sobrinhos e Sobrinhas, e aos meus amigos de São Cristovão, em especial, Irmã Palmira da Silva Gonçalves, meus sinceros agradecimentos.

Às irmãs Correia, Yvoneth, Cornélia, Virgínia e Terezinha pelo o exemplo de Fé e orações a mim dedicadas.

RESUMO

GOUVEIA, M. G. S. **EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *COMBRETUM DUARTEANUM* CAMBESS (COMBRETACEAE).** Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 2011.

A família Combretaceae compreende 20 gêneros com cerca de 600 espécies, o maior dos quais é o gênero *Combretum*, com cerca de 370 espécies. *Combretum duarteanum* Cambess é uma planta medicinal do norte e nordeste do Brasil, conhecida popularmente como "Vaqueta" ou "Caatinga-branca". As infusões preparadas com a parte aérea do *C. duarteanum* são usadas na medicina popular para o tratamento da dor e como sedativo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *C. duarteanum* (EEC). A atividade antioxidante foi investigada *in vitro* usando o ensaio da lipoperoxidação e teste para investigação da atividade sequestradora de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e óxido nítrico (NO). Nestes protocolos, o EEC apresentou efeito sobre a lipoperoxidação, com ação sequestradora dos radicais NO e $\bullet\text{OH}$. A atividade antinociceptiva foi investigada utilizando os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, formalina e placa quente em camundongos. O EEC (100, 200 e 400 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o comportamento nociceptivo dos animais (38,1, 90,6 e 97,8%, respectivamente). Este extrato também reduziu o tempo em que o animal lambeu a pata na 1ª fase (30,5 e 69,5%, 200 e 400 mg/kg) e 2ª fase (38,1, 90,6 e 97,8%, todas as doses) do teste da formalina. O EEC aumentou o tempo de permanência dos animais na placa quente, efeito este que foi revertido pela naloxona, sugerindo a participação do sistema opióide no mecanismo de ação do EEC. A administração do EEC (200 e 400 mg/kg; i.p.) exibiu atividade anti-inflamatória frente ao edema de pata induzido pela carragenina e ácido araquidônico em ratos. Esses resultados indicam que o EEC possui atividade antinociceptiva mediada por vias centrais, com possível participação do sistema opióide. Além de ação antinociceptiva e anti-inflamatória associadas a mecanismos periféricos, com provável ação inibitória da síntese de prostaglandinas e pela contribuição do seu potencial antioxidante.

Palavras-Chave: *Combretum duarteanum*, plantas medicinais, atividade antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória.

ABSTRACT

GOUVEIA, M. G. S. **ANTINOCICEPTIVE, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT EFFECTS OF ETHANOLIC EXTRACT OF *COMBRETUM DUARTEANUM* CAMBESS (COMBRETACEAE)**. Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 2011.

Combretum duarteanum Cambess is a medicinal plant from north and northeast of Brazil, know popularly as “Vaqueta” or “Caatinga-branca”. Infusions prepared with the aerial parts (stems and leaves) of *C. duarteanum* are used in folk medicine for the treatment of pain and as sedative. The objective of this study was to evaluate the antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant potentials of ethanolic extract of *Combretum duarteanum* (EEC). The antioxidant activity was investigated *in vitro* using lipid peroxidation, hydroxyl radical-scavenging, and scavenging activity of nitric oxide (NO) assays. EEC possesses a strong antioxidant potential according in these tests, and also presented scavenger activity of NO and hydroxyl. The antinociceptive activity was investigated using acetic acid-induced writhing, formalin, and hot plate tests in mice. EEC (100, 200, and 400 mg/kg; i.p.) significantly reduced the number of writhes (38.1, 90.6, and 97.8%, respectively). This extract also decrease the number of paw licks during phase 1 (30.5 and 69.5%, higher doses) and phase 2 (38.1, 90.6, and 97.8%, all doses) of a formalin test. EEC increased the latency of animals in the hot plate, effect that was reversed by naloxone, suggesting the involvement of opioid system in its mechanism of action. Administration of the EEC (200 and 400 mg/kg; i.p.) exhibited an anti-inflammatory activity in the carrageenin and arachidonic acid-induced rat paw edema test. These results indicate that the EEC has antinociceptive activity mediated by central pathways, with possible participation of the opioid system. Besides, antinociceptive and anti-inflammatory effects associated with peripherals mechanisms, with inhibitory action of prostaglandin synthesis and the contribution of its antioxidant potential.

Key words: *Combretum duarteanum*, medicinal plants, antinociceptive activity, antioxidant, anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeito do EEC sobre a peroxidação lipídica.....	54
Figura 2. Efeito do EEC sobre a produção de nitrito.....	55
Figura 3. Efeito do EEC sobre a produção das cespécies reativas ao Oxigenio.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do EEC nas contorções induzidas por Ac. Acetico.....	57
Tabela 2. Efeito do EEC sobre a nocicepção induzida pela formalina.....	58
Tabela 3. Efeito do ECC no teste da placa quente.....	59
Tabela 4. Efeito do EEC sobre o edema de pata induzido pela carreginina.....	60
Tabela 5. Efeito do EEC sobre o edema de pata induzido pelo Ac. Araquidônico.....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1. PLANTAS MEDICINAIS: BREVE HISTÓRICO	14
2.2. PRODUTOS ORIUNDOS DE PLANTAS	16
2.3. PLANTAS DO GÊNERO COMBRETUM	18
2.3.1. COMBRETUM DUARTERNUM CAMBESS	20
2.4. DOR E NOCICEPÇÃO	21
2.5. INFLAMAÇÃO	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 ARTIGO	28
5 CONCLUSÃO	62
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63
ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA	70
ANEXO B – COMPROVANTE DE ACEITE DO ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO...	71

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais pela humanidade se confunde com sua própria história. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VIEGAS-JÚNIOR et al., 2006).

A utilização de produtos naturais como matéria-prima na busca de substâncias com atividade biológica, especificamente os fármacos, tem sido extensamente relatado ao longo dos anos (SIMÕES et al., 1999). Os produtos naturais são fontes de novas substâncias bioativas potencialmente úteis como fármacos, principalmente os metabólitos oriundos de plantas e microorganismos (STROBEL et al., 2004). Nesse sentido, estudos têm mostrado o significativo papel dos produtos naturais na pesquisa de novas drogas, tanto na descoberta quanto no desenvolvimento.

Por exemplo, cerca de 60-75% das novas drogas utilizadas no tratamento de câncer e doenças infecciosas são de origem natural (NEWMAN et al., 2003). Para ilustrar o papel dos produtos naturais e dos seus derivados, na década de 1980, somente nos Estados Unidos, o mercado de preparações fitoterápicas aproximava-se de 8 bilhões de dólares/ano (CARLINI, 1988). Já no ano 1999 chegou a valores próximos de 12 bilhões de dólares/ano (CALIXTO, 2000). Entre 2001 e 2002 quase um quarto dos fármacos mais vendidos no mundo eram obtidos diretamente ou derivados de fontes naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Em 2006 o mercado mundial de fitoterápicos movimentou cerca de US\$ 22 bilhões/ano. No Brasil, esse mercado tem movimentado US\$ 400 milhões/ano (TOMAZZONI et al., 2006). É estimado que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas. Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial nos últimos anos do uso de fito fármaco como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças. Por exemplo, nos Estados Unidos, 24% das prescrições médicas utilizam um ou mais princípios ativos derivados de plantas e 2,5% utilizam o seu extrato bruto (CALIXTO et al., 1998).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), devido à pobreza e falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 65% a 80% da população

mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas medicinais como primeiro tratamento de saúde (CALIXTO, 2000). Esse mercado tão rico e próspero tem impulsionado várias pesquisas. Nos últimos anos, um grande número de estudos científicos tem se concentrado nas chamadas terapias tradicionais como importante fonte para pesquisas (CARLINI, 2003). A busca de novas drogas a partir de produtos naturais tem como alicerce a descoberta de drogas eficazes para o combate de diversas condições patológicas a custos menores; estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies; falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos e a descoberta de moléculas químicas basicamente impossíveis de serem sintetizadas com apreciável ação biológica (SILVA et al., 2005; BARBOSA-FILHO et al., 2006).

Desta forma, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz, tendo em vista que o uso popular de uma determinada planta não é suficiente para validá-la como fitoterápico. Desta forma, o emprego de técnicas modernas de farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular renovaram o interesse na procura de novos medicamentos ou protótipos de novos fármacos a partir de produtos naturais (SIMÕES, 1999; CALIXTO et al., 2000).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante de extrato etanólico bruto das folhas de *Combretum duarteanum* Cambess.

2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

A utilização de produtos naturais como matéria-prima na busca de substâncias com atividade biológica, especificamente os fármacos, tem sido extensamente relatada ao longo dos anos. A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de medicamentos, não foi representada apenas pelo surgimento de novos grupos de compostos, mas proporcionou a identificação de uma nova possibilidade terapêutica. (SIMÕES et al., 1999).

Desta forma, as plantas medicinais constituem uma fonte renovável de onde podem ser obtidos novos e eficazes medicamentos. A indicação de plantas medicinais aumenta a opção terapêutica, ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, com espectro de ação mais adequado e, talvez com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes sem substituir os medicamentos já comercializados e registrados (DI STASI, 1995; SIMÕES et al., 1999). Dentre os fatores que motivam a sua utilização, estão a insatisfação com os resultados obtidos em tratamentos com a medicina convencional, os efeitos indesejáveis e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto dos medicamentos sintéticos, a falta de acesso aos medicamentos e a medicina industrializada e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

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

Atualmente, não só no Brasil, mas também em diversos países, um grande número de vegetais vem sendo utilizado como fonte alternativa de medicamentos. Nos Estados Unidos, cerca de 25% de todos os medicamentos comercializados contêm, como princípio ativo, produtos de origem vegetal (LOURENZANI ;

BATALHA, 2004). Trata-se do denominado mercado mundial de medicamentos fitoterápicos que movimentam algo em torno de US\$ 22 bilhões ao ano. Com isso, este setor vem atraindo cada vez mais o interesse dos países desenvolvidos, chegando os Estados Unidos a movimentar cerca de US\$ 6, 5 bilhões em 2000 (PINTO et al., 2002)

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

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

Neste sentido, os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros), sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como GMPc, AMPc, proteínas quinases e cálcio, etc.), na expressão e transcrição de fatores como AP-1, NF-kB, e proto-oncogenes (c - jun, c-fos, and c-myc), e na expressão de moléculas pró-inflamatórias como síntese do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenase (COX-2), citocinas (IL-1beta, TNF-alfa, etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO et al., 2003).

2.2. Produtos Naturais Oriundos de Plantas

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

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

Podemos ainda mencionar outros fármacos provenientes de plantas medicinais como: forskolina, obtida de *Coleus barbatus*, que apresenta promissores efeitos contra a hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (DE SOUZA, 1993), a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica (KAMCHONWONGPAISON; MESHNICK, 1996), e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; CORRÊA, 1995)

Como descrito acima, os produtos naturais podem atuar em vários sistemas do organismo auxiliando, desta forma, na compreensão de mecanismos moleculares ou bioquímicos envolvidos em muitos processos fisiológicos ou fisiopatológicos (CALIXTO et al., 1998).

Todavia, os dados existentes na literatura sobre a atividade biológica de plantas preconizadas pela população, denominadas de plantas medicinais, são insuficientes para garantir sua qualidade, eficácia e segurança. Além disso, as plantas

contêm milhares de constituintes dos quais alguns apresentam relativa toxicidade, como as plantas citotóxicas utilizadas no tratamento do câncer, os digitálicos e alguns alcalóides, entre outros. Entretanto, os efeitos adversos dos agentes fitoterápicos são menos frequentes quando comparados com as drogas sintéticas (CALIXTO, 2000).

No Brasil, aproximadamente 84% das drogas atualmente no mercado são importadas e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro. Assim, é inegável que a maioria da população de baixa renda recorre às plantas medicinais para tratamento dos seus males (ELISABETSKY; WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999)

Dessa forma, observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Alguns fatores poderiam explicar o aumento do uso desses medicamentos, como os avanços ocorridos na área científica que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, como também uma forte tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (YUNES et al., 2001).

De acordo com a legislação em vigor no país, entende-se como fitoterápico "aquele medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais". É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase três. (BRASIL, 2004)

Silva et al. (2005) descreveram que, por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriam fundamental importância na medicina popular. Com o desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica. Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, de plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade. A procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas tem levado à descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Diversas plantas da flora

brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que dêem suporte científico ao seu uso na terapêutica. (SILVA et al., 2005).

2.3 Plantas do gênero *Combretum*

A família Combretaceae consiste em 18 gêneros, sendo o maior deles o gênero *Combretum*, o qual contém cerca de 370 espécies amplamente utilizadas na medicina popular. Este gênero, cuja espécie é mais abundante, está espalhado em várias partes da África (McGAW et al., 2001).

A população do sul da África emprega as plantas pertencentes à família Combretaceae para muitos propósitos medicinais como o tratamento de vários tipos de dor (incluindo as dores abdominais, dor nas costas, dor de ouvido, dor de dente e de cabeça), esquistossomose, tosse, resfriados, conjuntivites, diarreia, dismenorréia, parasitoses intestinais, infertilidade na mulher, lepra, pneumonia, mordida de cobra e escorpião, caxumba, sífilis, febre e fraquezas em geral (WATT; BREYER-BRANDWIJK, 1962; KOKWARO, 1976; GELFAND et al., 1985; HUTCHINGS et al., 1996; VAN WYK et al., 1997; McGAW et al., 2001).

Várias investigações sobre a atividade antimicrobiana dos membros da família Combretaceae têm sido realizadas. Demonstrou-se que a atividade antibacteriana está presente em extratos das folhas, dos ramos e dos frutos e foram isolados três compostos não identificados com atividade antibacteriana das folhas de *Combretum zeyheri* (BREYTENBACH; MALAN, 1989; McGAW et al., 2001).

Além disso, foi também demonstrado que a *Combretum erythrophyllum* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Esta atividade parece ser dependente de flavonóides encontrados nesta planta, entre eles destacam-se a apigenina, genkwanina, 5-hidroxi-7,4-metoxiflavona, rhamnocitrina, kaempferol, quercetina-5,3-dimetileter e rhamnazinae, entre outros (ALEXANDER et al., 1992; MARTINI; ELOFF, 1998; MARTINI et al., 2004). É importante salientar que todos estes compostos apresentam atividade significativa contra o *Vibrio colerae* e *Enterococcus faecalis*, com valores de CIM (concentração inibitória mínima) na faixa de 25-30 µg/ml (MARTINI et al., 2004).

Katerere et al (2003) mostraram que quatro triterpenos pentacíclicos isolados das folhas da espécie *Cobretum imberbe*, dos quais dois são novos glicosídeos

derivados do ácido $1\alpha,3\beta,23$ -trihidroxiolean-12-en-29-óico (ácido hidroxiimbérbico), também apresentaram atividades antibacterianas e, particularmente, o ácido imbérbico apresentou potente atividade contra *Mycobacterium fortuitum* e *Staphylococcus aureus*.

Além disso, foi demonstrada atividade antifúngica de sete espécies da família Combretaceae e sugere-se que esta atividade seria devido à presença de taninos e saponinas nos extratos destas espécies de plantas (BABA-MOUSSA et al., 1999).

Outros estudos têm demonstrado a atividade anti-inflamatória de algumas espécies deste gênero. Entre essas, destaca-se a *Combretum micranthum* em que demonstrou atividade anti-inflamatória com o extrato metanólico das folhas, nas doses de 50 e 100 mg/kg, no modelo de edema de pata induzido por carragenina; e também, nas mesmas doses, o extrato inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético e na dose de 100 mg/kg inibiu a formação de granuloma em ratos de forma similar à indometacina (5 mg/kg) (OLAJIDE, 2003).

Outras espécies que apresentaram alta atividade anti-inflamatória foram a *Combretum piculatum*, *Combretum mossambicense*, *Combretum imberbe*, e *Combretum molle*. Essa última espécie, juntamente com a *Combretum apiculatum*, também apresentou atividade antibacteriana significativa (McGAW et al., 2001).

A atividade antimicótica das plantas de gênero *Cobretum* também foi avaliada, sendo que as combretastatinas, isoladas da espécie *Combretum caffrum*, associadas ao fosfato como pró-drogas têm sido eficazes quando testadas clinicamente no tratamento de tumores sólidos. Consequentemente, esses compostos são mais interessantes do que outros agentes anti-micóticos e outra vantagem é que também são inibidores da angiogênese. Além disso, a sua eficácia está sendo avaliada no tratamento da retinopatia diabética, que é uma das maiores causa de cegueira (CIRLA; MANN, 2003).

Trabalhos fitoquímicos têm sido realizados com *Combretum* e diferentes espécies do gênero, as quais possuem vários compostos químicos bioativos (MASIKA; AFOLAYAN, 2002). Alguns destes compostos são: cicloartano, damarano e oleano tripernóides, flavonóides, dibenzil aromáticos, estilbenos, fenantrenos, lignanas e aminoácidos os quais são encontrados em várias espécies do gênero *Combretum* (CHOWDHURY; ISLAM, 2004).

2.3.1 *Combretum duarteanum* Cambess

A espécie *Combretum duarteanum* é caracterizada botanicamente como: arbusto ereto a escandente, de até 1,5 m de altura; planta lepidota, tricomas escamosos, hialinos ou ferrugíneos, revestindo caules, ramos, folhas, botões e frutos; caule e ramos estriados, cinéreos. Folhas opostas, curto-pecioladas (Figura 1A e B). Flores de 8-9 mm de comprimento, esverdeadas; bractéola de 1,1-2 mm comprimento, espatulada, com ápice acuminado (LOIOLA et al., 2007).

Espécie exclusiva da América do Sul, com registro na Bolívia, Paraguai e Brasil (EXELL, 1953). Segundo Loiola & Sales (1996), ocorre no Brasil nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco e Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso) e Sudeste (Minas Gerais e São Paulo). A presença desta espécie associada à ambientes de caatinga foi reportada para os estados da Bahia, Paraíba, Pernambuco e Sergipe (LOIOLA; SALES, 1996).



Figuras 1A e B. Partes aéreas e caule de *Combretum duarteanum* Cambess. (Foto: J. F. TAVARES, 2008)

Nascimento et al. (1990) investigaram a atividade antimicrobiana e a citotoxicidade de extratos de 30 espécies de plantas, relatando que apenas *C. duarteanum* demonstrou atividade antimicrobiana. Albuquerque et al. (2007) relataram que as folhas e flores de *C. duarteanum* Cambess possuem atividade expectorante.

2.4. Dor e nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor pode ser definida como uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada à lesão tecidual real ou potencial, ou descrita como tal”. Constitui um importante sistema de alarme do organismo para sinalizar a existência de ameaça à integridade tissular, sendo assim um dos sinais característicos da resposta inflamatória. Sempre que uma célula ou várias células em um tecido são lesadas, diversas substâncias são liberadas. Uma injúria periférica ou um nervo faz com que vários mediadores inflamatórios sejam liberados, sensibilizando vários receptores da dor (nociceptores) (KATZUNG, 2000; DELEO; WINKELSTEIN, 2002). Entretanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo ambiental, mas também cognitivo e emocional processado pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os receptores da dor na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres e sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON; BESSON, 1997).

A dor é usualmente desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). Entretanto, ela pode ser resultante de lesão nas fibras sensoriais, ou dano ocasionado no SNC (dor neuropática) (MILLAN, 1999).

Além disso, segundo Dickenson & Besson (1997), algumas alterações podem ocorrer como o aumento da resposta a um estímulo normalmente doloroso, o qual é denominado de hiperalgesia. Esta, normalmente é decorrente de importantes mudanças no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodina que se refere à dor evocada por estímulo inócuo (MILLAN, 1999).

A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo. Contudo, freqüentemente a dor torna-se crônica e debilitante em substituição à sua função de atuar como um sistema de aviso. A transcrição para a fase crônica envolve mudanças na medula espinhal e encéfalo, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas no nível do primeiro neurônio sensorial (JULIUS; BASBAUM, 2001).

O estímulo doloroso é propagado através de fibras aferentes primárias C ou A δ . Estas são fibras mielinizadas, que rapidamente conduzem o estímulo. As fibras C são amielinizadas e conduzem o estímulo nociceptivo com baixa velocidade; esse grupo é conhecido como nociceptores polimodais C (PMN) (JULIUS; BASBAUM, 2001).

As fibras C e A δ transferem a informação nociceptiva para a lâmina superficial (lâmina I e II), lâmina profunda (V e VI) no corno dorsal, e também para a lâmina circumcanular (lamina X). Por outro lado, as fibras A δ são fibras de maior calibre, mielinizadas e de rápida condutância e transmitem a informação de estímulos mecânicos inócuos para a lâmina profunda (III e IV) (MILLAN, 2002).

As fibras aferentes primárias (PAFs) podem estimular diretamente neurônios de projeção, os quais retransmitem a mensagem para o cérebro, ou indiretamente enviam a mensagem para outros neurônios de projeção via interneurônios excitatórios. Além disso, as PAFs também podem estimular interneurônios inibitórios os quais integram com os neurônios de projeção (MILLAN, 2002).

As fibras primárias fazem uma sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantemente na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender no trato espinotalâmico chegando até principalmente no tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO; BROSE, 1998).

Além disso, o trato espinotalâmico parece emitir axônios ao mesencéfalo e a ponte rostral, fazendo sinapses em complexos nucleares, incluindo o núcleo magno da rafe e o núcleo reticular gigantocelular. Ambas as estruturas parecem estar envolvidas na regulação nociceptiva descendente dos neurônios de segunda ordem (RUSSO e BROSE, 1998; BESSON, 1999; MILLAN, 1999).

As vias aferentes da dor são constituídas de diferentes tratos ascendentes que formam dois sistemas filogenéticos distintos. O primeiro, mais antigo, passa através da região medial da medula espinhal, sendo formado pelos tratos: paleoespinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálo, espinoparabrachio-amigdalóide, espinobrachio-hipotalâmico e espinotalâmico. O outro sistema, mais

recente, ocupa a região lateral da medula espinhal e consiste no trato neoespinotalâmico, espinocervical e pós-sináptico no corno dorsal (ALMEIDA et al., 2004).

As vias descendentes originadas de estruturas cerebrais têm um importante papel na modulação e integração das mensagens nociceptivas no corno dorsal da medula. Vias serotoninérgicas e em menor proporção as vias dopaminérgicas compreendem os maiores componentes dos mecanismos descendentes (MILLAN, 1999).

De fato, vias descendentes também podem modular a nocicepção interagindo com vários elementos neuronais no corno dorsal: (1) terminais das PAFs; (2) neurônios de projeção; (3) interneurônios excitatórios; (4) terminais de outras vias descendentes. É importante mencionar que os neurônios de projeção e interneurônios específicos para a nocicepção, estão predominantemente localizados na lâmina superficial, respondendo somente a estímulos dolorosos, enquanto outros, principalmente na lâmina profunda, são excitados somente por estímulos inócuos (MILLAN, 2002).

Observando os mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso descrito acima, pode-se afirmar que a dor não é uma sensação uniforme, a qualidade da dor e o início das respostas de proteção são determinados por muitos fatores dentro da medula espinhal e estruturas do cérebro, envolvidos na integração e modificação da sinalização nociceptiva (DICKENSON; BESSON, 1997).

Neste sentido, existem várias fontes importantes onde os mediadores que participam da resposta nociceptiva são gerados como: tecido lesado, sistema vascular, células imunes, tecidos adjacentes, nervos sensoriais e simpáticos. Esses mediadores atuam em receptores amplamente distribuídos no organismo. Alguns desses receptores são acoplados a proteínas G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons (DICKENSON; BESSON, 1997).

Alguns desses mediadores que estimulam o tipo químico de dor incluem: bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina, íons potássio, ácidos, acetilcolina e enzimas proteolíticas. Além destas, as prostaglandinas (PGs) e a substância P (SP) acentuam a sensibilidade das terminações da dor (GUYTON; HALL, 2002; MILLAN, 1999, 2002).

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos que permite a entrada do sinal nociceptivo para a medula espinhal e é encontrado nos terminais nervosos dos neurônios nociceptivos espinhais (WESTLUND et al., 1992; BROMAN; ADAHL, 1994; VALLANO, 1998).

2.5. Inflamação

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

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

Esses efeitos são estabelecidos por eicosanóides clássicos, como as prostaglandinas e leucotrienos, que exercem importantes funções como mediadores locais e exercem expansivas ações em resposta de interesse na inflamação. Estudos recentes têm identificado novos mediadores químicos, como as citocinas (interleucina-10, fator de crescimento beta) e gases (óxido nítrico), além de novas funções para nucleosídeos e nucleotídeos no processo inflamatório (SERHAN; CHIANG, 2004).

Os mediadores da inflamação, portanto, são substâncias formadas e liberadas, concomitantemente ou sequencialmente, no local da lesão. A origem destes mediadores pode ser plasmática (fatores do complemento e bradicinina) ou celular (histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, fator ativador plaquetário-PAF e etc). Os mediadores estão envolvidos na gênese e manutenção dos

eventos característicos de reação inflamatória e se ligam a receptores específicos nas células-alvos podendo, inclusive, estimular a liberação de outros mediadores (ZHOU et al., 2007).

O processo inflamatório consiste na primeira linha de defesa a estímulos lesivos exógenos (agentes infecciosos, traumas físicos ou químicos) ou endógenos (imunológicos, neurológicos) com finalidade de reconstruir a estrutura e função do tecido ou órgão afetado (GARCIA-LEME et al., 1993).

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

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

A resposta imune aparece quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta aos organismos estranhos ou substâncias antigênicas a resposta imunológica liberadas durante a resposta inflamatória aguda ou crônica. A resposta imune pode ser dividida em resposta inata e adaptativa; o sistema imune inato é ativado imediatamente após uma infecção, desencadeando a resposta do hospedeiro ao microorganismo infectante e emitindo um sinal de ativação para a resposta imunológica adaptativa. Eventos como vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada e infiltração celular é parte da resposta imune inata, e seus

componentes celulares primários são os macrófagos, células dendríticas, células natural killer (NK) e neutrófilos. Proteínas efetoras circulantes como o sistema complemento, reagentes de fase aguda e a cascata de coagulação têm importante função na imunidade inata.

A resposta imunológica adaptativa ou específica só é desencadeada após o reconhecimento do patógeno pela resposta imune inata, a qual deflagra todo um conjunto de reações singularmente específicas contra o invasor e também torna as ações dos componentes da resposta inata muito mais eficazes. Os linfócitos são os principais componentes celulares da resposta adquirida, sendo divididos em linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, isto é, produção de anticorpos; linfócitos T, que fazem a indução da resposta e são responsáveis pelas reações imunológicas mediadas por células; e as células NK, células linfóides ativas na resposta inata (DI VAIO; FREITAS, 2001; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

3. OBJETIVO

3.1 GERAL

- Avaliar os efeitos antinociceptivo, antioxidante e anti-inflamatório do extrato etanólico obtido das folhas de *Combretum duarceanum* Cambess (EEC) *in vivo* e *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito antinociceptivo do (EEC) em testes de nocicepção induzida por estímulos químicos (ácido acético e formalina) e térmicos em camundongos;
- Verificar a atividade antioxidante do EEC sobre a lipoperoxidação e atividade sequestradora através de ensaios *in vitro*;
- Avaliar o possível efeito anti-inflamatório do EEC nos testes de edema de pata induzidos por carragenina e ácido araquidônico;
- Contribuir para o estudo farmacológico da espécie.

4. ARTIGO

***Antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory properties
of the ethanolic extract of Combretum duarceanum in rodents***

Artigo aceito pelo periódico:

Journal of Medicinal Food

Fator de impacto no *Journal Citation Reports*[®] (JCR): 1.34

**Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory
properties of the ethanolic extract of *Combretum
duarteanum* in rodents**

Running title: Pharmacological effects of *C. duarteanum*

Marcos G.S. Gouveia¹, Maria A. Xavier¹, André S. Barreto¹, Daniel P. Gelain¹, João P.A. Santos¹, Adriano A.S. Araújo¹, Francilene A. Silva¹, Jullyana S Quintans¹, Maria F. Agra², Analúcia G.S. Cabral², Josean F. Tavares², Marcelo S. Silva² and Lucindo J. Quintans-Júnior^{1,*}

¹*Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil (DFS/UFS;* ²*Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil (LTF/UFPB).*

*Corresponding author. Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe-UFS, Av. Marechal Rondon, s/n, São Cristóvão, Sergipe-Brazil. Tel.: +55-79-21056645; fax: +55-79-3212-6640. E-mail address: lucindo_jr@yahoo.com.br; lucindo@pq.cnpq.br

Abstract

The antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract from leaves of *C. duarteanum* (EEC) were assessed in rodents through *in vitro* tests. The antioxidant activity was investigated *in vitro* using TBARS, hydroxyl radical-scavenging, and scavenging activity of nitric oxide (NO) assays. The antinociceptive activity was investigated using acetic acid-induced writhing, formalin, and hot plate tests in mice. The anti-inflammatory activity was assessed using carrageenan-induced hind paw edema in rats and arachidonic acid-induced rat paw edema. EEC possesses a strong antioxidant potential according to the TBARS, NO, and hydroxyl radical-scavenging assays; it also presented scavenger activity in all *in vitro* tests. Following intraperitoneal (i.p.) injection, EEC (100, 200, and 400 mg/kg) significantly reduced the number of writhes (38.1, 90.6, and 97.8%, respectively) in a writhing test, and the number of paw licks during phase 1 (30.5 and 69.5%, higher doses) and phase 2 (38.1, 90.6, and 97.8%, all doses) of a formalin test when compared to the control group. Since naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) antagonized the antinociceptive action of EEC (400 mg/kg), this suggested, at last, participation of the opioid system. Administration of 200 and 400 mg/kg (i.p.) of the EEC exhibited an anti-inflammatory activity in the carrageenin test, which was based on interference with prostaglandin synthesis, as confirmed by the arachidonic acid test. Together, these results indicate that properties of EEC might be further explored in order to achieve newer tools for treatment of inflammatory painful conditions, including those related to pro-oxidant states.

Keywords: *Combretum duarteanum*, medicinal plants, antioxidant, anti-inflammatory, pain.

1. Introduction

Medicinal plants, those considered possessing therapeutic properties, have been used since the beginning of human civilization for treating different diseases, and their use as an effective strategy for the promotion of human health has significantly increased in recent years. This fact is related to several factors, including the safety, effectiveness, and better quality control of the phytomedicines available on the market today.¹⁻³ Although in recent years notable progress has been made concerning the development of natural therapies, there is an urgent need to discover effective and potent analgesic and anti-inflammatory agents.⁴⁻⁶

The plants of the family Combretaceae comprise 20 genera with approximately 600 species, the largest of which are *Combretum*, with about 370 species, and *Terminalia*, with about 200 species.^{7,8} Some species of *Combretum* have a broad spectrum of biological activities, including antibacterial, antiprotozoal, anticancer, cytotoxic, analgesic, and anti-inflammatory.^{7,9-12}

Combretum duarteanum Cambess is a plant from the north and northeast of Brazil, known by the popular name of “vaqueta” or “caatinga-branca”.^{8,13} Infusions prepared with the aerial parts (stems and leaves) of *C. duarteanum* are used in folk medicine for the treatment of pain and as sedative.^{8,14} We found no relevant literature substantiating the botanical, chemical, and pharmacological studies of this species.

Free radicals and related reactive species are strongly involved in several pathological and physiological processes, including cancer, cell death, inflammation, and pain.¹⁵ Many natural products exert significant redox activities, which are related to their therapeutical properties or even a possible toxic effect.¹⁶ The evaluation of the redox properties of such compounds is crucial for both understanding the

potential mechanisms of their biological actions and to determine possible toxic or harmful side-effects. Considering the lack of experimental evidence and scientific investigations on the possible therapeutic and/or redox properties of *C. duarteanum*, the purpose of the present study was to evaluate the redox properties plus the possible antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanolic extract obtained from the leaves of *C. duarteanum* (EEC) in rodents.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Leaves of *C. duarteanum* were collected in the region around Serra Branca, Paraiba, Brazil, during March 2007. The plant was identified by Prof. Maria de Fátima Agra (PhD) from the Federal University of Paraiba, and a voucher specimen was deposited at the Lauro Pires Xavier Herbarium (JPB) (Voucher N° 6767).

2.2. Preparation of EEC

Leaves of *C. duarteanum* were dried in an oven at 40 °C, and subsequently pulverized. The plant material was cold macerated with ethanol 95% for 72 h and the extract was concentrated using a rotary evaporator. A dry solid (40 g) was obtained corresponding to a yield of 10%.

2.3. Chemicals

Sodium nitroprusside, FeSO₄, Griess' modified reagent, 2-deoxyribose, 2-thio-barbituric acid, AAPH (2,2'-azobis[2-methylpropionamidine]dihydrochloride), trichloroacetic acid, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic

acid), acetic acid, norhydroguaiaretic acid, and polyoxyethylene-sorbitan monolate (Tween 80) were purchased from Sigma Co. (USA). Morphine (MOR), naloxone (NAL), and aspirin (acetylsalicylic acid) were purchased from União Química (Brazil). All drugs and the EEC were administered intraperitoneally (i.p.) in volumes of 0.1 ml/10g (mice) and 0.1 ml/100g (rats).

2.4. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) assay

TBARS (thiobarbituric acid reactive species) assay was employed to quantify lipid peroxidation¹⁷ and an adapted TBARS method was used to measure the antioxidant capacity of EEC using egg yolk homogenate as a lipid rich substrate.¹⁶ Briefly, egg yolk was homogenized (1% w/v) in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4), and 1 ml of homogenate was sonicated and then homogenized with 0.1 ml of EEC at different concentrations. Lipid peroxidation was induced by addition of 0.1 ml of AAPH solution (0.12 M). Control was only EEC vehicle (ethanol 0.1%). Reactions were carried out for 30 min at 37 °C. After cooling, samples (0.5 ml) were centrifuged with 0.5 ml of trichloroacetic acid (15%) at 1200 x g for 10 min. An aliquot of 0.5 ml from supernatant was mixed with 0.5 ml TBA (0.67%) and heated at 95 °C for 30 min. After cooling, sample absorbance was measured using a spectrophotometer at 532 nm. The results were expressed as percentage of TBARS formed by AAPH alone (induced control).

2.5. Hydroxyl radical-scavenging activity

The formation of •OH (hydroxyl radical) from Fenton reaction was quantified using 2-deoxyribose oxidative degradation.¹⁸ The principle of the assay is the quantification of the 2-deoxyribose degradation product, malondialdehyde, by its

condensation with 2-thiobarbituric acid (TBA). Briefly, typical reactions were started by the addition of Fe^{2+} (FeSO_4 6 mM final concentration) to solutions containing 5 mM 2-deoxyribose, 100 mM H_2O_2 , and 20 mM phosphate buffer (pH 7.2). To measure EEC antioxidant activity against hydroxyl radical, different concentrations of EEC were added to the system before Fe^{2+} addition. Reactions were carried out for 15 min at room temperature and were stopped by the addition of 4% phosphoric acid (v/v) followed by 1% TBA (w/v, in 50 mM NaOH). Solutions were boiled for 15 min at 95 °C, and then cooled to room temperature. The absorbance was measured at 532 nm and results were expressed as MDA equivalents formed by Fe^{2+} and H_2O_2 .

2.6. Scavenging activity of nitric oxide (NO)

Nitric oxide was generated from spontaneous decomposition of sodium nitroprusside in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4). Once generated, NO interacts with oxygen to produce nitrite ions, which were measured by the Griess reaction.¹⁹ The reaction mixture (1 ml) containing 10 mM sodium nitroprusside (SNP) in phosphate buffer and EEC at different concentrations were incubated at 37 °C for 1 h. A 0.5 ml aliquot was taken and homogenized with 0.5 ml Griess reagent. The absorbance of chromophore was measured at 540 nm. Percent inhibition of nitric oxide generated was measured by comparing the absorbance values of negative controls (only 10 mM sodium nitroprusside and vehicle) with assay preparations. Results were expressed as percentage of nitrite formed by SNP alone.

2.7. Animals

Male Swiss mice (27-32 g) and male Wistar rats (150-205 g), 2-3 months of age, were used throughout this study. The animals were randomly housed in

appropriate cages at 22 ± 1 °C on a 12 h light/dark cycle (lights on 06:00-18:00) with free access to food (Purina) and water. They were used in groups of 10 animals each. In the carrageenan-induced hind paw edema test, rats were used in groups of 6 animals each. Experimental protocols and procedures were approved by the Federal University of Sergipe Animal Care and Use Committee (CEPA/UFS N° 13/09).

2.8. Acetic acid-induced writhing

This test was done using the method described by Koster et al. and Broadbear et al.^{20,21} Initially the mice were divided into five groups (n = 10). Subsequently, EEC (100, 200, and 400 mg/kg), vehicle (saline/Tween-80 0.2%; control group), and morphine (MOR, 5 mg/kg) were administered intraperitoneally (i.p.) 60 min before an injection of 0.85% acetic acid (0.25 ml/animal). Each animal was isolated in an individual observation chamber, and 15 min after acetic acid injection the cumulative number of writhing responses was recorded for a period of 15 min.

2.9. Formalin test

The formalin test was carried out as described by Hunskaar and Hole.²² The animals were divided into six groups (n = 10) and treated i.p. with vehicle (control), EEC (100, 200, and 400 mg/kg), MOR (5 mg/kg), and 200 mg/kg of aspirin. After 60 min, twenty microliters of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde) in a phosphate-buffer (pH 7.2) was injected into the dorsal surface of the left hind paw using a microsyringe with a 26-gauge needle. The duration of paw licking was measured at 0-5 min (first phase) and 15- 30 min (second phase) after formalin administration.

2.10. Possible antagonism of the EEC antinociceptive effect by pretreatment with naloxone

Mice were i.p. pretreated (n = 10) with 1.5 mg/kg of naloxone (NAL), a nonselective opioid antagonist, 15 min before the i.p. administration of vehicle (control), EEC (400 mg/kg), or MOR (5 mg/kg). Subsequently, the acetic acid-induced writhing test was performed as described above.

2.11. Hot plate test

The hot plate test was carried out as described by Eddy and Leimbach.²³ In this test, reaction of mice to painful stimulus was measured. Mice were placed individually on the metal plate heated to 52 ± 0.5 °C and covered with a glass cylinder (25 cm high, 15 cm in diameter). The time (s) elapsing to the first pain response (licking of the forepaws or jumping) was determined by a stopwatch and then recorded. The experiments were conducted 60 min following the i.p. administration of the EEC (100, 200, and 400 mg/kg). The effect of pretreatment with naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) on the antinociception produced by EEC (400 mg/kg) and morphine (5 mg/kg, i.p.) was determined.

2.12. Rota-rod test

Initially, the mice able to remain on the Rota-rod apparatus (AVS[®], Brazil) longer than 180 s (9 rpm) were selected 24 h before the test.²⁴ Then, the selected animals were divided into five groups (n = 10) and treated i.p. with vehicle (control), EEC (100, 200, and 400 mg/kg), and diazepam (3 mg/kg). Thirty minutes later, each animal was tested on the Rota-rod and the time (s) they remained on the bar for up to 180 s was recorded after 60 min.

2.13. Carrageenan-induced hind paw edema in rats

The acute hind paw edema was produced by injecting 0.1 ml of carrageenan (prepared as 1% suspension in distillate water) locally into the plantar aponeurosis of the right hind paw of rats.²⁵ EEC (100, 200, and 400 mg/kg, i.p.) was administered to different groups (n = 8) while the other groups served as negative and positive controls and received vehicle (control) and the standard drug, aspirin (200 mg/kg, i.p.), respectively. EEC and aspirin were administered 1 h prior to the injection of carrageenan. The rat paw volume up to the ankle joint was measured using a plethysmometer (LE 7500, PanLab, Spain) at 0 (just before) and 3 h after the injection of carrageenan. Increase in the paw edema volume was considered as the difference between 0 and 3 h.

2.14. Arachidonic acid-induced rat paw edema

Rat paw edema was induced in animal groups (n = 8) by subplantar injection into the right hind paw with 0.1 ml 0.5% arachidonic acid dissolved in carbonate buffer, pH 8.5. Norhydroguaiaretic acid (NDGA, 100 mg/kg) as reference and EEC (200 and 400 mg/kg) were administered intraperitoneally 60 min before arachidonic acid injection. Edema volume was measured by a plethysmography immediately after arachidonic acid injection and at 30 min intervals thereafter for a period of 2 h.²⁶

2.15. Statistical analysis

The obtained data were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's or Fisher's tests. In all cases differences were considered significant if $p < 0.05$.

The percent of inhibition by an antinociceptive agent was determined for the acetic acid-induced writhing and formalin tests using the following formula: Inhibition % = 100. (control-experiment)/control.²⁷ Percent inhibition of edema volume between treated and control groups was calculated using the following formula: Inhibition % = 100. (V_c - V_t)/V_c. Where V_c and V_t represent mean increase in paw volume in control and treated groups, respectively.

3. Results and Discussion

Membrane lipids are the most susceptible target of free radical attack and propagation in biological systems.²⁸ Additionally, free radicals and related reactive species are strongly involved in several pathological and physiological processes, including cancer, cell death, inflammation, and pain.^{15,19} Thus, we assessed the antioxidant potential of EEC by testing its ability to prevent oxidative damage to lipids induced by a free radical source *in vitro* (AAPH). Quantification by TBARS demonstrated that EEC exerts a significant antioxidant effect against peroxyl radicals generated by AAPH, protecting lipids from oxidation in a dose-dependent fashion (Figure 1). Trolox (300 μM), a synthetic analogue of vitamin E that protects membranes from oxidative damage *in vivo*, was used as a general antioxidant standard for comparison. Therefore, it is possible that EEC interacts more strongly with specific types of lipids, and in a lipid-rich system, such as in the TBARS assay lipids with lesser affinity to EEC and/or hydrophilic portions of amphipathic lipids, is more susceptible to radical attack, allowing the initiation of lipoperoxidation chain reaction.¹⁶

INSERT FIGURE 1

We next investigated the antioxidant potential of EEC against two different reactive species *in vitro*. EEC exerted a significant scavenging effect against NO, but higher concentrations reversed this NO-inhibiting effect and led to a small increase in NO production compared to lower concentrations (Figure 2).

INSERT FIGURE 2

On the other hand, EEC had a strong scavenging effect against hydroxyl radicals generated *in vitro*, in a dose-dependent fashion (Figure 3). These results suggest that the protection against lipoperoxidation chain reactions observed in TBARS assay is probably due to interaction of EEC components with hydroxyl radicals, which is a reactive oxygen species (ROS), instead with NO, which is a reactive nitrogen species (RNS). Although EEC demonstrated a NO-scavenging effect at certain concentrations, some of its components probably enhance NO production or cancel the effect of NO-scavengers in EEC when present at higher concentrations. Shifts from antioxidant to pro-oxidant effects against specific radicals are common when analyzing complex mixtures such as plant extracts, since many components present different redox properties depending on their concentrations.^{16,19,28}

INSERT FIGURE 3

In the acetic acid-induced writhing test, the antinociceptive effect represented by writhes reduction, elicited by 100, 200, and 400 mg/kg of EEC (1.5 ± 0.6 , $4.1 \pm$

1.2, and 3.1 ± 0.9 , respectively) in mice was similar to that of morphine 5 mg/kg (1.3 ± 0.5), a standard opioid drug, when groups were compared with control (12.6 ± 2.7) (Table 1). It was observed that naloxone (1.5 mg/kg, i.p.) antagonized the antinociceptive response of morphine from 1.3 ± 0.5 (with vehicle only) to 10.2 ± 2.9 (with vehicle plus naloxone) writhes in the acetic acid-induced writhing test. Similarly, naloxone antagonized the effect of EEC (400 mg/kg) (9.7 ± 4.7) when compared with control (Table 1).

INSERT TABLE 1

Our results show that EEC produced a dose-dependent inhibition of the inflammatory pain in mice as determined by a significant reduction in acetic acid-induced abdominal writhing. Acetic acid-induced abdominal constriction is a standard, simple, and sensitive test for measuring analgesia induced by both opioids and peripherally acting analgesics.²² This test, besides being the most appropriate antinociceptive model for opioids,^{29,30} is also commonly employed as a visceral inflammatory pain model.³¹ In acetic acid-induced abdominal writhing, pain is elicited by the injection of an irritant such as acetic acid into the peritoneal cavity, which produces episodes of characteristic stretching (writhing) movements, and inhibition of the number of episodes by analgesics is easily quantifiable.^{16,32} Central analgesic action was suggested by the blocking effect of naloxone, a specific antagonist of morphinomimetic receptors.³³

EEC significantly inhibited the licking response to the injected paw when 400 mg/kg (612.8 ± 5.9 s) was administered i.p. in mice compared with the control group (42.0 ± 7.2 s) in the first phase of the formalin test, respectively (Table 2). However,

EEC (200 and 400 mg/kg) significantly ($P < 0.001$) inhibited the second phase. As expected, morphine (5 mg/kg) also reduced the licking time in both phases of this test (2.1 ± 0.9 s; 4.8 ± 2.1 s), while aspirin (200 mg/kg) reduced it only during the second phase (3.9 ± 1.6 s). EEC (100 mg/kg) did not produce any significant changes in both phases of the formalin test.

INSERT TABLE 2

The advantage of using the formalin model of nociception is that it can discriminate pain in its central and peripheral components.^{34,35} The test consists of two different phases separated in time: the first one is generated in the periphery through the activation of nociceptive neurons by the direct action of formalin, and the second phase occurs through the activation of the ventral horn neurons at the spinal cord level. Morphine, a typical narcotic drug, inhibits nociception in both phases,³⁶ but drugs with peripheral action, such as indomethacin and corticosteroids, inhibit only the second phase. Moreover, drugs such as acetylsalicylic acid and paracetamol, which inhibit prostaglandin synthesis, block only the second phase of the formalin test.^{22,37}

The analgesic action presented by EEC involves supraspinal as well as spinal components, as demonstrated by the utilization of the hot plate test.³⁸ The results suggest that EEC (100, 200, and 400 mg/kg, i.p.) has a central analgesic effect (Table 3), as evidenced by the prolonged delay in response time when mice were subjected to a nociceptive stimulus during a hot plate test. This central analgesic action was confirmed by the blocking effect of naloxone.³³

INSERT TABLE 3

In the rota-rod test, EEC treated mice did not show any significant motor performance alterations with the doses of 100, 200, or 400 mg/kg (Data not shown). As might be expected, the CNS depressant diazepam (3 mg/kg, i.p.), standard drug, reduced the time of treated animals on the rota-rod after 60 min (41.5 ± 10.5 s) compared with the control group.

The mean increase in paw edema volume was about 0.89 ± 0.15 ml in the vehicle-treated control rats. EEC (200 and 400 mg/kg, i.p.) significantly ($p < 0.05$) reduced the mean paw edema volume at 3 h after carrageenan injection. EEC (200 and 400 mg/kg, i.p.) exhibited anti-inflammatory activity with the percent inhibition of paw edema of 53.9 and 56.2, respectively, as compared with the control group. However, the standard drug, aspirin (200 mg/kg, i.p.) showed highly significant ($p < 0.01$) anti-inflammatory activity with the percent inhibition of 76.4 (Table 4).

INSERT TABLE 4

Various mediators are released by carrageenan in the rat paw. Thus, while the initial phase may be due to the release of histamine and serotonin, kinins may play a role in the middle phase³⁹ and prostaglandins could be the most important mediators in the final 3–5 h post-carrageenan response.^{26,40} Table 4 shows that EEC more strongly inhibited paw edema, suggesting that the extract has a possible selective inhibitory effect on the release or actions of prostaglandin mediators. Besides, the antioxidant action of EEC observed in the TBARS and NO assays suggests that this extract may act as a protective agent against oxidative damage to membrane

polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as arachidonic acid, which is a very important component in the response to pain via the cyclooxygenase (COX) pathway.⁴¹

Moreover, the paw edema induced by arachidonic acid is a widely used method for distinguishing between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors.⁴² Subplantar injection of arachidonic acid produced significant edema as early as after 30 min and reached a peak at 90 min (200 and 400 mg/kg).

INSERT TABLE 5

The EEC (200 and 400 mg/kg) reduced edema formation when administered intraperitoneally, similar to NDGA (reference drug) (Table 5). The rat paw edema induced by arachidonic acid is perceptibly reduced by inhibitors of arachidonic acid metabolism and by corticosteroids, and is insensitive to selective cyclooxygenase inhibitors.⁴³ On the basis of the present results, we may propose that EEC has an anti-inflammatory action interfering with prostaglandin synthesis.

4. Conclusion

Our results support that the ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC) exhibits an antioxidant action preventing lipoperoxidation, probably due to hydroxyl radical scavenging activity, and a clear antinociceptive activity in mice. It probably exerts its antinociceptive effect by central inhibitory mechanisms (opioid system) and not due to changes in motor coordination. The probable anti-inflammatory activity of the extract may play a role in action interfering with prostaglandin

synthesis, and also might involve redox-mediated mechanisms. Further studies currently in progress will enable us to understand the precise action mechanisms.

Acknowledgments

We thank Mr Osvaldo Andrade Santos for the technical support. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Edital MCT/CNPq 14/2008 Universal, Processo nº 470290/2008] and Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ-PB) [Edital 001/2008 FAPESQ-PB/MCT/CNPq, termo 191/08].

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist. All the authors have substantially participated in the investigation, data analysis, and the preparation of the manuscript and accept full responsibility for its content.

References

1. Quintans-Júnior LJ, Souza TT, Leite BS, et al.: Phytochemical screening and anticonvulsant activity of *Cymbopogon winterianus* Jowitt (Poaceae) leaf essential oil in rodents. *Phytomedicine* 2008;15:619-624.
2. De Souza MM, Pereira MA, Ardenghi JV, et al.: Filicene obtained from *Adiantum cuneatum* interacts with the cholinergic, dopaminergic, glutamatergic, GABAergic, and tachykinergic systems to exert antinociceptive effect in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93:40-46.
3. Menezes IAC, Moreira IJA, Paula JWA, et al.: Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. *J Pharm Pharmacol* 2010;62:215–221.
4. Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos AR, Cechinel Filho V, Yunes RA: Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother Res* 2000;14:401-418.
5. Barbosa-Filho JM, Medeiros KCP, Diniz MFFM, et al.: Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 2006;16:58-285.
6. Melo MS, Sena LCS, Barreto FJN, et al.: Antinociceptive effect of citronellal in Mice. *Pharm Biol* 2010;48:411-416.

7. Pietrovski EF, Rosa KA, Facundo VA, Rios K, Marques MCA, Santos ARS: Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxiup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;83:90-99.
8. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, et al.: Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 2007;114:325-354.
9. McGaw LJ, Rabe T, Sparg SG, Jager AK, Eloff JN, Staden Van J: An investigation on the biological activity of *Combretum* species. *J Ethnopharmacol* 2001;75:45-50.
10. Lira SRD, Almeida RN, Almeida FRC, Oliveira FS, Duarte JC: Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *Combretum leprosum*. *Pharm Biol* 2002;40:213-215.
11. Young SL, Chaplin DJ: Combrestatin A-4 phosphate: background and current clinical status. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2004;13:1171-1182.
12. Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN: Biological activity of antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 2004;93:207-212.
13. Nascimento SC, Chiappeta AA, Lima RMOC: Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil. *Fitoterapia* 1990;61:353-355.

14. Agra MF, Baracho GS, Nurit B, Basílio IJLD, Coelho VPM: Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol* 2007; 111:383-395.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in biology and medicine, 4th ed. Oxford University Press, Oxford, 2007.
16. Guimarães AG, Oliveira GF, Melo MS, et al: Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, “In press”, 2010.
17. Esterbauer H, Cheeseman KH: Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;186:407-421.
18. Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M: Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta* 1999;1472:142-152.
19. Basu S, Hazra B: Evaluation of nitric oxide scavenging activity, *in vitro* and *ex vivo*, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. *Phytother Res* 2006;20:896-900.
20. Koster R, Anderson M, Beer EJ: Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proceed* 1959;18:412-416.

21. Broadbear JH, Negus SS, Butelman ER, Costa BR, Woods, JH: Differential effects of systemically administered nor-binaltorphimine (nor-BNI) on κ -opioid agonists in mouse writhing assay. *Psychopharmacology* 1994;15:311-319.
22. Hunskaar S, Hole K: The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30:103-104.
23. Eddy NB, Leimbach D: Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther* 1953;107:385-393.
24. Oliveira FA, Almeida RN, Sousa MF, Barbosa-Filho JM, Diniz SA, Medeiros IA: Anticonvulsant properties of *N*-salicyloyltryptamine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;68:199–202.
25. Winter CA, Riseley EA, Nuss GW: Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;111:544-547.
26. Arrigoni-Blank MF, Dmitrieva EG, Franzotti EM, Antonioli AR, Andrade MR, Marchioro M: Anti-inflammatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L.) HBK (Piperaceae). *J Ethnopharmacol* 2004;91:215–218.
27. Reanmongkol W, Matsumoto K, Watanabe H, Subhadhirasakul S, Sakai SI: Antinociceptive and antipyretic effects of alkaloids extracted from the stem bark of *Hunteria zeylanica*. *Biol Pharm Bull* 1994;17:1345-1350.

28. Halliwell B: Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 2008;476:107-112.
29. Hayes AG, Sheehan MJ, Tyers TB: Differential sensitivity of models of antinociception in the rat, mouse and guinea-pig to *mu*- and *kappa*-opioid receptor agonists. *Br J Pharmacol* 1987;91:823-832.
30. Shaw JS, Rourke JD, Burns KM: Differential sensitivity of antinociceptive tests to opioid agonists and partial agonists. *Br J Pharmacol* 1988;95:578-584.
31. Barber A, Gottschlich R: Opioid agonists and antagonists: An evaluation of their peripheral actions in inflammation. *Med Res Rev* 1992;12:525-562.
32. Melo MGD, Araujo AAS, Rocha CPL, et al: Purification, physicochemical properties, thermal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladina kalbii*. *Biol Pharm Bull* 2008;31:1977-1980.
33. Belvisi MG, Chung DM, Barnes PJ: Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1998;95:413-418.
34. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K: The formalin test: An evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5-17.

35. Quintans-Júnior LJ, Melo MS, De Sousa DP, et al.: Antinociceptive activity of citronellal in formalin-, capsaicin- and glutamate-induced orofacial nociception/pain in rodents and its action on nerve excitability. *J Orofac Pain* 2010;24:305-312.
36. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R: Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347-352.
37. Rosland JH, Tjolsen A, Maehle B, Hole K: The formalin test in mice effect of formalin concentration. *Pain* 1990;42:235-242.
38. Yaksh TL, Rubi TA: Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science* 1976;192:1357-1358.
39. Di Rosa M, Sorrentino L: The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. *Eur J Pharmacol* 1968;4:340-342.
40. Vinegar R, Schreiber W, Hugo R: Biphasic development of carrageenan edema in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1969;166:96-103.
41. Salvemini D, Doyle TM, Cuzzocrea S: Superoxide, peroxynitrite and oxidative/nitrative stress in inflammation. *Biochem Soc Trans* 2006;34:965-970.

42. Griswold DE, Marshall PJ, Webb EF, et al.: SK&F 86002: a structurally novel anti-inflammatory agent that inhibits lipoxygenase and cyclooxygenase mediated metabolism of arachidonic acid. *Biochem Pharmacol* 1987;36:3463-3470.
43. DiMartino MJ, Campbell Jr GK, Wolf CE, Hanna N: The pharmacology of arachidonic acid-induced rat paw edema. *Agents and Actions* 1987;21:303-305.

Figure legends

List of abbreviations: (EEC) *Ethanollic extract of C. duarteanum*; (MOR) *morphine*; (NAL) *naloxone*; (NDGA) *Norhydroguaiaretic acid*; (PUFAs) *Polyunsaturated fatty acids*; (RNS) *Reactive nitrogen species*; (AAPH) *2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihydrochloride*; (LPO) *Lipid peroxidation*; (MDA) *Malondialdehyde*; (NO) *Nitric oxide scavenging assay*; (OH) *Hydroxyl radical scavenging assay*; (ROS) *Reactive oxygen species*; (TAR) *Total antioxidant reactivity*; (TBA) *Thiobarbituric acid test*; (TRAP) *Total antioxidant potential*; (WHO) *World Health Organization's* .

Figure 1 - Thio-Barbituric Acid-Reactive Substances (TBARS) *in vitro*. A lipid-rich system was incubated with a free radical source (AAPH) and the effect of different concentrations of EEC on the lipoperoxidation was measured by quantifying TBARS. Control is incubation medium without AAPH; other groups contained AAPH alone or in the presence of different concentrations of EEC. Trolox was used as standard antioxidant. Bars represent mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$ (1-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison posthoc test).

Figure 2 - Nitric oxide (NO) scavenging assay. Nitric oxide is generated from spontaneous decomposition of sodium nitroprusside (SNP) and interacts with oxygen to produce nitrite ions, which are measured by the Griess reaction. SNP group is sodium nitroprusside alone, other groups denote nitrite production by SNP in the presence of different concentrations of EEC. Bars represent mean $\pm$ SEM.

*** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison posthoc test was applied to all data.

Figure 3 - Hydroxyl radical-scavenging activity was quantified using 2-deoxyribose oxidative degradation *in vitro*, which produces malondialdehyde by condensation with 2-thiobarbituric acid (TBA). System is MDA production from 2-deoxyribose degradation with FeSO_4 and H_2O_2 alone. Other groups denote MDA production by FeSO_4 and H_2O_2 in the presence of different concentrations of EEC. Bars represent mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.0001$; * $p < 0.05$. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison posthoc test was applied to all data.

FIGURES

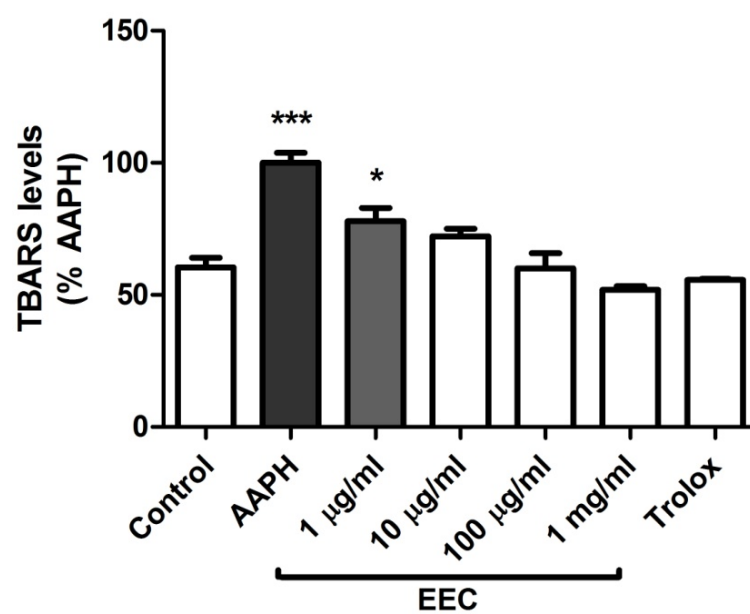


FIGURE 1.

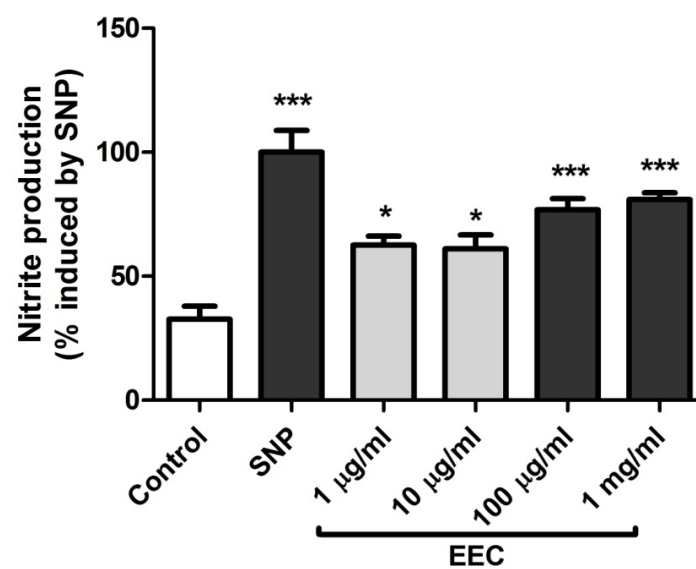


FIGURE 2.

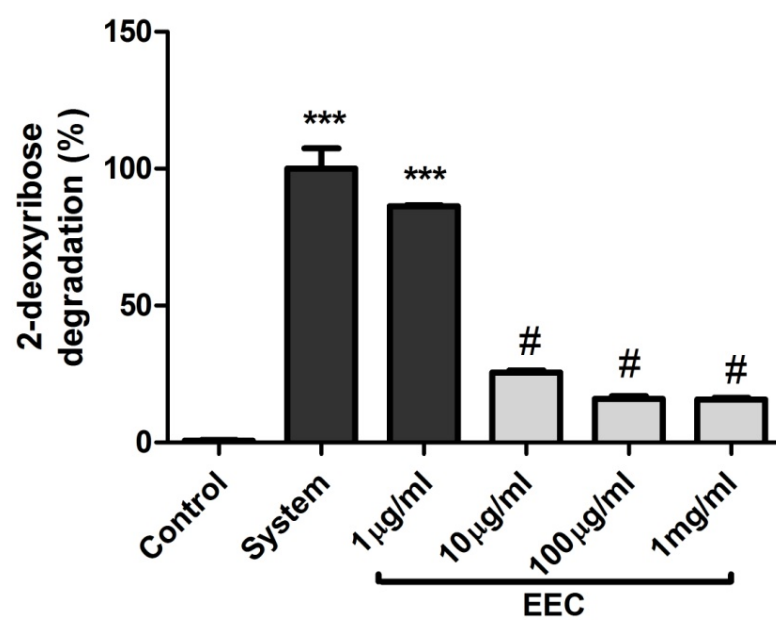


FIGURE 3.

TABLES

Table 1 - Effect of ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC), morphine (MOR) and naloxone (NAL) on writhing induced by acetic acid.

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of writhings ^a	% Inhibition
Vehicle	-	12.6 ± 2.7	-
EEC	100	1.5 ± 0.6 ^c	88.1 ^d
EEC	200	4.1 ± 1.2 ^c	68.3 ^d
EEC	400	3.1 ± 0.9 ^c	75.4 ^d
EEC + NAL	400 + 1.5	9.7 ± 4.7	23.0
MOR	5	1.3 ± 0.5 ^c	89.7 ^d
MOR + NAL	5 + 1.5	10.2 ± 2.9	19.1

n = 10

^a Values represent mean ± S.E.M.

^b *P* < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^c *P* < 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^d *P* < 0.01 (Fisher's test), significantly different from control.

Table 2 - Effect of ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC), morphine (MOR) and aspirin on formalin-induced pain

Treatment	Dose (mg/kg)	Number of licks (s)			
		0-5 min		15-30 min	
		Score of pain ^a	% inhibition	Score of pain ^a	% inhibition
Vehicle	-	42.0 ± 7.2	-	54.0 ± 11.2	-
EEC	100	45.0 ± 6.6	- 7.1	33.4 ± 9.1	38.1 ^d
EEC	200	29.2 ± 9.8	30.5 ^d	5.1 ± 4.4 ^c	90.6 ^f
EEC	400	12.8 ± 5.9 ^b	69.5 ^e	1.2 ± 0.4 ^c	97.8 ^f
MOR	5	2.1 ± 0.9 ^c	95.0 ^f	4.8 ± 2.1 ^c	91.1 ^f
Aspirin	200	35.4 ± 9.8	15.7	3.9 ± 1.6 ^c	92.8 ^f

n = 10

^a Values represent mean ± S.E.M.

^b *P* < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^c *P* < 0.001 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^d *P* < 0.05 (Fisher's test), significantly different from control.

^e *P* < 0.01 (Fisher's test), significantly different from control.

^f *P* < 0.001 (Fisher's test), significantly different from control.

Table 3 - Effect of ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC) or morphine (MOR) on the hot plate test in the absence and presence of naloxone in mice.

Treatment	Dose (mg/kg)	Reaction time (licking of the hind paws) (s) ^a			
		Basal	0.5h	1h	1.5h
Vehicle	-	7.5 ± 2.1	9.8 ± 1.8	8.9 ± 1.1	7.7 ± 1.6
EEC	100	6.8 ± 3.7	11.7 ± 1.6	15.3 ± 1.4 ^b	15.9 ± 1.4 ^b
EEC	200	9.1 ± 1.9	12.9 ± 1.3	17.6 ± 1.3 ^b	14.5 ± 1.8 ^b
EEC	400	8.5 ± 2.7	13.4 ± 1.3	16.2 ± 2.7 ^b	18.4 ± 2.0
EEC + NAL	400 + 1.5	9.2 ± 2.5	11.0 ± 2.7	12.5 ± 2.8	10.2 ± 2.1
MOR	5	8.2 ± 3.3	25.5 ± 3.6 ^c	27.3 ± 4.5 ^d	29.3 ± 1.9 ^d
MOR + NAL	5 + 1.5	7.8 ± 3.4	9.4 ± 2.1	13.4 ± 3.3	8.8 ± 3.9

n = 10

^a Values represent mean ± S.E.M.

^b *P* < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^c *P* < 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^d *P* < 0.001 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

Table 4 - Effect of ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC) or aspirin on carrageenan -induced hind paw edema in rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Carrageenan -induced hind paw edema volume (ml) ^a	% inhibition
Vehicle	-	0.89 ± 0.15	-
EEC	100	0.73 ± 0.17	18.0
EEC	200	0.41 ± 0.12 ^b	53.9 ^d
EEC	400	0.39 ± 0.09 ^b	56.2 ^d
Aspirin	200	0.21 ± 0.05 ^c	76.4 ^d

n = 8

^a Values represent mean ± S.E.M.

^b *P* < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett`s test), significantly different from control

^c *P* < 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett`s test), significantly different from control

^d *P* < 0.01 (Fisher`s test), significantly different from control.

Table 5 - Effect of ethanolic extract of *C. duarteanum* (EEC) on arachidonic acid-induced rat paw edema

Time (min)	Arachidonic acid-induced hind paw edema volume (ml) ^a			
	Control	NDGA	EEC 200 mg/kg	EEC 400 mg/kg
30	0.31 ± 0.04	0.08 ± 0.03 ^d	0.26 ± 0.09 ^d	0.17 ± 0.06 ^d
60	0.51 ± 0.05	0.12 ± 0.05 ^d	0.29 ± 0.11 ^c	0.23 ± 0.13 ^d
90	0.53 ± 0.04	0.18 ± 0.10 ^d	0.32 ± 0.07 ^c	0.22 ± 0.09 ^d
120	0.56 ± 0.06	0.23 ± 0.12 ^d	0.45 ± 0.16	0.36 ± 0.09 ^c
% Inhibition ^b	-	68.1 ^f	30.9 ^e	48.7 ^f

n = 8

^a Values represent mean ± S.E.M.

^b Percent inhibition of total edema response.

^c *P* < 0.05 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^d *P* < 0.01 (one-way ANOVA and Dunnett's test), significantly different from control

^e *P* < 0.05 (Fisher's test), significantly different from control.

^f *P* < 0.01 (Fisher's test), significantly different from control.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que o extrato etanólico do *Combretum duarتمانum*, nas doses e concentrações utilizadas, apresentou significativa atividade antioxidante, sendo capaz de prevenir a peroxidação lipídica e promover o sequestro de espécies reativas ao nitrogênio e ao oxigênio, além de possuir atividade antinociceptiva periférica e central, e pelo menos em parte envolve possivelmente mecanismos opióides. Este extrato também apresentou efeito anti-edematogênico, possivelmente por sua capacidade de agir sobre a produção de mediadores envolvidos na resposta inflamatória.

Por fim, este estudo demonstrou o efeito antinociceptivo da espécie *Combretum duarتمانum*. No entanto, mais estudos são necessários para a melhor elucidação do mecanismo de ação deste extrato e avaliação da sua segurança terapêutica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, 114, p.325–354, 2007.

ALEXANDER, D. M.; BHANA, N. BHIKA, K. H.; ROGERS, C. B. Antimicrobial testing of selected plant extracts from *Combretum* species. **South African Journal of Science**, v. 88, p. 342-344, 1992.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLAT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**., v. 1000, p. 40-56, 2004.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, P. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, p. 335-338, 1999.

BALUNAS, M. J.; DOUGLAS KINGHORN, A. D. Drug Discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 258-285, 2006.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-1615, 1999.

BRASIL. Presidência da República. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p 2, 2006a.

BRASIL. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, jun. 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 48 de 16 de março de 2004. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Diário Oficial, Brasília, 18 mar, 2004.

BREYTENBACH, J. C.; MALAN, S. F. Pharmacochemical properties of *Combretum zeyheri*. **South African Journal of Science**, v. 85, p. 372-374, 1989.

BROMAN, J E ADAHL, F. Evidence for vesicular storage idence for vesicular storage of glutamate in primary afferent termof glutamate in primary afferent terminals. **NeuroReport**, v. 5, p. 1994.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.

CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. A review of the plants of the genus *pyllanthus*: Their chemistry. **Pharmacology and Therapeutic potential**, Med. Res. Rev. v. 8, p. 228, 1998.

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

CALIXTO, J. B.; OTUK, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part I. Action on Arachidonic Acid pathway, Nitric oxide and Nuclear Factor k B (NF-kB). **Planta Medica**, v. 69, p. 1-12, 2003.

CARLINI, E. A. Uma abordagem científica da homeopatia. **Ciência Hoje**, v. 7, n. 39, p. 52-59, 1988.

CHOWDHURY, R.; ISLAM, N. Ahydroxylated mansumbinem-28-oic acid from *Combretum coccineum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 443-445, 2004.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drug Discovery. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 558-564, 2003.

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

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

DE SOUZA, N. J. Industrial development of traditional drugs: The forskolin example a mini-review. **Jornal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 167-175.1993.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. **The Pharmac of Pain**. Berlin: Springer, 1997.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Ed. UNESP, 1995.

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

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substancias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al.Org. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianopolis: Ed. Iniversidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999. p. 87-99.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 137-143, 1993.

EXELL, A.W. The *Combretum* species of the new world. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 55 (356), p. 130-141, 1953.

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

GELFAND, M.; MAVI, S.; DRUMMOND, R. B.; NDEMERA, B. **The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe**. Harare: Editora Mambo Press, 1985.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

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

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

HUTCHINGS, A.; SCOTT, A. H.; LEWIS, G.; CUNNINGHAM, A. B. **Zulu Medicinal Plants: An Inventory. Pietermaritzburg:** University of Natal Press, 1996.

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

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

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

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, p. 81-88, 2003.

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

KOKWARO, O. **Medicinal Plants of East Africa.** Nairobi: East African Literature, 1976.

LOIOLA, M. I. B.; SALES, M. F. Estudos taxonômicos do gênero *Combretum* Loefl. (Combretaceae R. Br.) em Pernambuco – Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 34 (2), p. 173-190. 1996.

LOIOLA, M. I. B.; ROCHA, E. A.; AGRA, M. F.; BARACHO, George Sidney. **Flora da Paraíba, Brasil: Combretaceae. R. Br. In:** 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo-SP. Resumos 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007.

LOURENZANI, A. E. B. S.; LOURENZANI, W.L.; BATALHA, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. **Inform Econ**, v. 34, p. 15-25, 2004.

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

MARTINI, N. ELOFF, J. N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 255-263, 1998.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 207-212, 2004.

MASIKA, P. J. e AFOLAYAN, A. J. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 129-134, 2002.

McGAW, L. J.; RABE, T.; SPARG, S. G.; JAGER, A. K.; ELOFF, J. N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum species*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 45-50, 2001.

MILLAN, M. J. The induction of pain: An Integrative Review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending Control of Pain. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 355-474, 2002.

NASCIMENTO, S. C. et al. **Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco, Brazil**. Fitoterapia, Milão, v. 61 (3), p. 353-355, 1990.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as source of new drugs over period 1981-2002. **Natural Products Reports**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLAJIDE, O. A.; MAKINDE, J. M.; OKPAKO, D. T. Evaluation of the antiinflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G. Don. (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 11, p. 293-298, 2003.

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

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

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

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

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Ann. Rev. Med**, v. 49, p. 123-133, 1998.

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

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

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

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

SILVA, M.A.; RAFACHO, B.P.; HIRUMA-LIMA, C.A.; ROCHA, L.R.M.; BRITO A.R.M.S.; VILEGAS W. Evaluation for *Strychnos pseudoquina* St. Hil. leaves extract on gastrointestinal activity in mice. **Chem Pharm Bull**, v. 53, p. 881-885, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; OSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Universidade Federal de Santa Catarina e Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Editora da Universidade e Editora da UFSC, 1999.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M.L. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica**. Texto & Contexto Enferm. Florianópolis, v. 15 (1), p. 115-121, 2006.

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

VALLANO, M. L. Developmental aspects of NMDA receptor function. **Crit. Reviews of Neorobiology**, v. 12, p. 177-204, 1998.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. Pretoria: Editora Briza Publications, 1997.

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

VIEGAS JR., C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29 (2), p. 326-337, 2006.

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

WATT, J. M.; BREYER-BRANDWIJK, M. G. **The Medicinal and Poilsonian Plants of Southern and Eastern Africa**. Londres: Editora Livingstone, 1962.

WESTLUND, K. N.; CARLTON, S. M.; ZHANG, D.; WILLIS, W. D. Glutamate-immunoreactive terminal synapse on primate spinothalamic tract cells. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 322, p. 519-527, 1992.

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

ZHOU, H. Y. et al. Anti-Inflammatory of (alfa, beta)- methymelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, v. 572, p. 239-248, 2007.



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 "Avaliação farmacológica comportamental do extrato de *Combretum duartamum* Cambess em roedores", sob coordenação do Prof. Dr. Lucindo José Quintans Júnior (protocolo CEPA 13/2009), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 15/05/2009.

São Cristóvão, 15 de maio de 2009

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

De: shendler@ucsd.edu (shendler@ucsd.edu)

Para: lucindo_jr@yahoo.com.br;

Data: Segunda-feira, 7 de Março de 2011 19:46:00

Cc:

Assunto: Journal of Medicinal Food - Decision on Manuscript ID JMF-2010-0212.R2

07-Mar-2011

Dear Dr. Quintans-Junior:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract of *Combretum duarteanum* in rodents" in its current form for publication in Journal of Medicinal Food.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101. If you prefer to send the copyright form via e-mail please send to ebicovny@liebertpub.com. Do NOT email these forms to the Editorial office.

Consider Liebert Open Option to have your paper made Free Online immediately upon publication for a one-time fee. If the paper has NIH funding, it will also be uploaded onto PubMedCentral on behalf of the author. Benefits of Liebert Open Option include: fast track publication; email message highlighting the article; increased readers, citations, and downloads; and an identifying icon in the table of contents if published in print. Subsequent accepted papers are eligible for a reduced fee for Open Option. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Journal of Medicinal Food, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Sheldon Hendler, Ph.D., M.D.

Editor-in-Chief, Journal of Medicinal Food

shendler@ucsd.edu