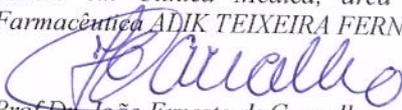


ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DA
***Plathymenia reticulata* BENTH. (LEGUMINOSAE)**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica, área de Ciências Básicas, da Farmacêutica ALIK TEIXEIRA FERNANDES.


Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
Orientador

CAMPINAS
2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DOS EXTRATOS OBTIDOS DA
***Plathymenia reticulata* BENTH. (LEGUMINOSAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica na área de Ciências Básicas.

Orientador

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

CPQBA/UNICAMP

CAMPINAS
2002

UNIDADE	80
Nº CHAMADA	T/UNICAMP F391a
V	EX
TOMBO BCI	54392
PROC.	124103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	18/06/03
Nº CPD	

CM00184825-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

BIB ID 293803

F391a Fernandes, Alik Teixeira
Atividade farmacológica dos extratos obtidos da *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae) / Alik Teixeira Fernandes.
Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : João Ernesto de Carvalho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Analgesia. 3. Plantas medicinais. 4. Câncer.
I. João Ernesto de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): *Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho*

J. Carvalho

Membros:

1. Professora Doutora Vera Lúcia Garcia Rehder

Vera Lucia Garcia Rehder

2. Professora Doutora Elaine Reed

Elaine Reed

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/08/02

2002 1037
FEOT 28002

Aos meus pais, Wagner e Dilma, pelo amor, apoio, incentivo e sacrifícios...

Por me oferecerem sempre o melhor e por serem

um exemplo que norteia minha vida.

À Lana e Thaís,

minhas irmãs e melhores amigas.

Às tias Dê e Jó...

... Como é bom desfrutar do amor de vocês...

Ao Marcos, pela paciência, colaboração

e acima de tudo, por me fazer tão feliz !

Dedico a vocês este trabalho, com todo meu carinho e gratidão !

*Ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho pelas oportunidades,
além dos ensinamentos, estímulo e atenção
durante a realização deste trabalho.*

Agradecimentos

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - Unicamp, por oferecer suas instalações para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela inserção no programa de pós-graduação;

À Dra. Mary Ann Foglio pela orientação na realização do trabalho fitoquímico, além de todo seu carinho e estímulo.

À Maria Carolina Bayeux Leme de Oliveira por dividir comigo as dificuldades e as experiências adquiridas durante a realização deste trabalho. E acima de tudo, pela convivência que tanto me ensina e pela amizade que construímos nestes anos.

À Ana Possenti, pela colaboração na realização dos experimentos e principalmente pelo apoio e carinho dedicados a mim desde que cheguei à Campinas;

À Márcia Aparecida Antônio pela amizade, paciência e disposição em colaborar para a realização deste trabalho,

À Luciana Konecny Kohn e Sirlene Valério Tinti pela amizade e colaboração na realização dos experimentos;

À Profa. Lourdes Cardozo Laureano, da Universidade Católica de Goiás, pela atenção e auxílio na escolha, coleta e identificação da espécie vegetal;

Aos professores Dr. José Realino de Paula e Dr. Heleno Dias Ferreira, da Universidade Federal de Goiás, pela colaboração na identificação e processamento da espécie vegetal;

À Profa. Suely Alencar Santana pela amizade, incentivo e por despertar em mim o interesse no estudo de plantas medicinais;

À Débora Christian Fachim Nogueira pelo apoio e incentivo indispensáveis para o início do mestrado;

Aos amigos, Helena Muller Queiroz, Carina Denny, Aparecida Érica Bighetti, Patrícia Corrêa Dias, Cristiana Madjarof, Thalita Pedroni Formariz, Carolina Salgado, Rosane da Silva Rodrigues, Fernanda Oliveira de Gaspari de Gaspi e Orlando Alves Júnior, que de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho;

Aos colegas da Divisão de Fitoquímica do CPQBA, especialmente Dra. Cármen Lúcia Queiroga e Rodney Rodrigues pelo auxílio na realização das extrações e agradável convivência;

À Renata Maia e Luiz Eduardo Odoniu, secretários do departamento de Pós-Graduação, pela colaboração e paciência no decorrer desses anos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro;

À Deus, pelo verdadeiro amor que dá sentido à minha vida, pela oportunidade de crescer sempre amparada por seus cuidados e, principalmente por Jesus Cristo, meu Senhor, Salvador e amigo.

*“Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos
se percebeu, nem com os olhos se viu Deus além de ti,
que trabalha para aquele que nele espera.”*

(Isaiás 64:4)

RESUMO.....	33
INTRODUÇÃO.....	39
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	47
OBJETIVOS.....	63
MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
MATERIAIS.....	69
1. Coleta do material vegetal.....	69
2. Material químico.....	71
2.1 Drogas.....	71
2.2 Solventes e reagentes.....	71
3. Linhagens Celulares.....	72
4. Animais.....	73
MÉTODOS.....	73
1. Processamento Fitoquímico.....	73
1.1 Obtenção dos Extratos Brutos de <i>Plathymenia reticulata</i>	73
1.2 Triagem Fitoquímica.....	74
1.3 Fracionamento de Extrato Bruto Hidroalcoólico a Frio.....	77
2. Testes de Atividade Farmacológica.....	78
2.1 Atividade Antiinflamatória.....	78

2.1.1	Edema de pata induzido por carragenina.....	78
2.1.2	Edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados.....	79
2.1.3	Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	79
2.1.4	Modelo de peritonite induzida por carragenina.....	80
2.2	Atividade Antiproliferativa.....	80
2.3	Atividade Antinociceptiva.....	81
2.3.1	Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	81
2.3.2	Teste de algesia induzida por calor.....	81
2.3.3	Teste da formalina.....	82
2.3.4	Modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina.....	82
2.3.5	Avaliação da participação do sistema opioidérgico no efeito analgésico de <i>P. reticulata</i> Influência do tratamento com naloxona.....	83
	Influência do tratamento com naloxona quaternária.....	83
3.	Análise Estatística.....	84
RESULTADOS.....		85
1.	Processamento Fitoquímico.....	87
1.1	Obtenção dos extratos brutos de <i>Plathymenia reticulata</i>	87
1.2	Cromatografia em camada delgada.....	88
1.3	Triagem fitoquímica.....	89
1.4	Obtenção das frações de <i>Plathymenia reticulata</i>	91

2. Testes de Atividade Farmacológica.....	93
2.1 Atividade Antiinflamatória.....	93
2.1.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	93
2.1.2 Edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenolectomizados.....	98
2.1.3 Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	102
2.1.4 Modelo de peritonite induzida por carragenina.....	103
2.2 Atividade Antiproliferativa.....	105
2.2.1 Curva concentração-resposta da indometacina.....	105
2.2.2 Curva concentração-resposta do EBHF.....	106
2.2.3 Curva concentração-resposta da fração básica (FB).....	107
2.2.4 Curva concentração-resposta da fração neutra (FN).....	108
2.2.5 Curva concentração-resposta da fração ácida (FA).....	109
2.2.6 Curva concentração-resposta do EBAE.....	110
2.3 Atividade Antinociceptiva.....	111
2.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	111
2.3.2 Teste de algesia induzida por calor.....	115
2.3.3 Teste da formalina.....	117
2.3.4 Modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina.....	119
2.3.5 Avaliação da participação do sistema opioidérgico no efeito analgésico de <i>P. reticulata</i> Influência do tratamento com naloxona.....	123
Influência do tratamento com naloxona quaternária.....	125

DISCUSSÃO.....	127
CONCLUSÕES.....	145
SUMMARY.....	149
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155

Lista de Figuras

- FIGURA 1:** Exemplar de *Plathymenia reticulata* Benth. coletada no município de Senador Canedo, estado de Goiás.....70
- FIGURA 2:** Fluxograma de Triagem Fitoquímica para verificação dos principais grupos químicos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *Plathymenia reticulata*.....75
- FIGURA 3:** Fluxograma de obtenção dos extratos brutos (EBHF e EBHQ) a partir da entrecasca seca e moída de *Plathymenia reticulata*.....87
- FIGURA 4:** Fluxograma de obtenção do extrato bruto acetato de etila (EBAE) a partir da entrecasca seca e moída de *Plathymenia reticulata*.....88
- FIGURA 5:** Cromatografia em camada delgada dos extratos EBHF, EBHQ e EBAE obtidos da entrecasca seca e moída de *Plathymenia reticulata*.....89
- FIGURA 6:** Fluxograma de obtenção das frações (FB, FN e FA) a partir do EBHF de *Plathymenia reticulata*.....92

Lista de Gráficos

- GRÁFICO 1:** Efeito da administração oral de indometacina e dos extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) de *Plathymenia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos.....94
- GRÁFICO 2:** Curva dose – efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) de *Plathymenia reticulata* no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....95
- GRÁFICO 3:** Efeito da administração oral de indometacina, do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) e do extrato bruto acetato de etila (EBAE) obtidos de *Plathymenia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos.....97
- GRÁFICO 4:** Efeito da administração oral de indometacina, dexametasona e do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) obtidos de *Plathymenia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados.....99

GRÁFICO 5: Efeito da administração oral de indometacina, do extrato bruto (EBHF) e das frações obtidas de <i>Plathymenia reticulata</i> no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	101
GRÁFICO 6: Efeito da administração oral de dexametasona e dos extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) de <i>Plathymenia reticulata</i> no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos.....	102
GRÁFICO 7: Migração leucocitária induzida pela carragenina em camundongos previamente tratados com salina, dexametasona, indometacina e com o extrato bruto hidroalcoólico de <i>P. reticulata</i> (EBHF).....	104
GRÁFICO 8: Curva concentração-atividade da indometacina sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	105
GRÁFICO 9: Curva concentração-atividade do EBHF de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	106
GRÁFICO 10: Curva concentração-atividade da fração básica (FB) de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	107
GRÁFICO 11: Curva concentração-atividade da fração neutra (FN) de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	108

GRÁFICO 12: Curva concentração-atividade da fração ácida (FA) de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	109
GRÁFICO 13: Curva concentração-atividade do extrato bruto acetato de etila (EBAE) de <i>Plathymenia reticulata</i> sobre as linhagens celulares tumorais humanas.....	110
GRÁFICO 14: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos previamente tratados pela via oral com salina, indometacina e com os extratos brutos hidroalcoólicos de <i>P. reticulata</i> (EBHQ e EBHF).....	112
GRÁFICO 15: Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos previamente tratados pela via oral com salina, indometacina, extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF) e extrato bruto acetato de etila (EBAE) de <i>P. reticulata</i>	114
GRÁFICO 16: Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados pela via intraperitoneal com salina, morfina e com o extrato bruto hidroalcoólico de <i>P. reticulata</i> (EBHF).....	116
GRÁFICO 17: Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados pela via oral com salina, indometacina e com o extrato bruto hidroalcoólico de <i>P. reticulata</i> (EBHQ).....	118

- GRÁFICO 18:** Reatividade à aplicação intraplantar de capsaicina na pata posterior de camundongos previamente tratados pela via oral com salina, morfina e com o extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) de *P. reticulata*.....120
- GRÁFICO 19:** Influência do tratamento prévio com salina sobre a atividade antinociceptiva da morfina ou do EBHF de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....122
- GRÁFICO 20:** Influência do tratamento prévio com naloxona sobre a atividade antinociceptiva da morfina ou do EBHF de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....123
- GRÁFICO 21:** Influência do tratamento prévio com salina sobre a atividade antinociceptiva da loperamida ou do EBHF de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....124
- GRÁFICO 22:** Influência do tratamento prévio com naloxona quaternária sobre a atividade antinociceptiva da loperamida ou do EBHF de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....126

Lista de Tabelas

TABELA 1: Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas na triagem do efeito antiproliferativo.....	72
--	----

Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina (5-hidroxitriptamina)
786-0	Linhagem celular representativa de neoplasia renal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico.
ATP	Trifosfato de Adenosina
C₁ a C₉	Componentes do Sistema Complemento
C₄H₈O₂	Acetato de Etila
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
COX-3	Ciclooxigenase-3
DAG	Diacilglicerol
EBAE	Extrato bruto acetato de etila
EBHF	Extrato bruto hidroalcoólico a frio
EBHQ	Extrato bruto hidroalcoólico a quente
FA	Fração Ácida
FAINE	Fármaco Antiinflamatório não Esteroidal
FB	Fração Básica
FN	Fração Neutra
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HCl	Ácido Clorídrico

HETE	Ácido Hidróxieicosatetraenóico
HT-29	Linhagem celular representativa de neoplasia de cólon
IFN-α	Interferon- α
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-1ra	Interleucina receptor antagonist
LSP	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrieno
LTB₄	Leucotrieno B ₄
MCF-7	Linhagem celular representativa de neoplasia de mama
Na₂SO₄	Sulfato de Sódio Anidro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCI	National Cancer Institute
NCI-460	Linhagem celular representativa de neoplasia de pulmão tipo não pequenas células
NCI-ADR	Linhagem celular representativa de neoplasia de mama que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
NOS_c	Óxido Nítrico sintase constitutiva
NOS_e	Óxido Nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido Nítrico sintase indutível
OVCAR-03	Linhagem celular representativa de neoplasia de ovário

PAF	Fator ativador plaquetário
PC-03	Linhagem celular representativa de neoplasia de próstata
PCK	Proteína Quinase C
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGG₂	Prostaglandina G ₂
PGI₂	Prostaciclina I ₂
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PMN	Leucócito Polimorfonuclear
RPMI	Meio de Cultura RPMI 1640
SFB	Soro fetal bovino desativado
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato gastro intestinal
TNF	Fator de necrose tumoral
TXA₂	Tromboxano A ₂
UACC-62	Linhagem celular representativa de melanoma

Resumo

A *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae), conhecida popularmente como vinhático, encontra-se amplamente distribuída em regiões do Cerrado brasileiro. A infusão em água fria da entrecasca do caule é utilizada popularmente para tratamento de diversos processos inflamatórios. O material vegetal foi coletado no município de Senador Canedo, Estado de Goiás, para a obtenção de extratos brutos hidroalcoólicos (70%), a partir de extrações a frio (EBHF) e a quente (EBHQ), e do extrato bruto acetato de etila (EBAE). Estes extratos foram posteriormente avaliados em modelos de inflamação, algesia e câncer.

A realização de uma triagem fitoquímica com os extratos hidroalcoólicos detectou a presença de flavonóides, taninos, antocianinas e saponinas. O processo de purificação do EBHF foi direcionado para obtenção de frações ricas em substâncias de caráter ácido (FA), básico (FB) e uma fração neutra (FN).

A atividade antiedematogênica dos extratos brutos e frações de *Plathymenia reticulata* foi avaliada no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Neste ensaio, apenas os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHF e EBHQ) promoveram uma inibição do edema principalmente após 4 e 5 horas da administração do agente flogístico. As frações FB e FN de *P. reticulata* inibiram o edema após 4 e 5 horas da administração de carragenina. A fração ácida (FA) não foi ativa neste modelo. No ensaio de dermatite induzida por óleo de cróton, também utilizado para avaliar a atividade antiedematogênica de *P. reticulata*, nenhum dos extratos foram capazes de inibir a formação do edema. A atividade do EBHF sobre a migração leucocitária foi testada no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos. A administração oral do EBHF reduziu o número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal, seguindo perfil semelhante ao da dexametasona. A indometacina, antiinflamatório

não esteroidal, também reduziu a migração leucocitária em 67%. Estes resultados sugerem uma possível influência dos extratos brutos hidroalcoólicos na síntese de prostanóides.

Com o objetivo de avaliar a relação entre as substâncias que inibem a expressão da enzima ciclooxigenase e a atividade citocida ou citostática em células tumorais, foi realizado o estudo da atividade antiproliferativa dos extratos e frações obtidos de *P. reticulata*.

O EBHF e as frações FB e FN apresentaram seletividade, efeito citostático para todas as linhagens celulares e citocida para células de pulmão, ovário e melanoma. A fração FA apenas inibiu o crescimento das linhagens de ovário e melanoma. Os resultados obtidos demonstraram uma correlação entre a atividade antiproliferativa e antiinflamatória, provavelmente relacionada à inibição da enzima COX-2.

O extrato bruto acetato de etila (EBAE), apesar de não ser considerado ativo no modelo de edema de pata, foi avaliado sobre as células derivadas de tumores humanos, demonstrando seletividade para a linhagem de mama com efeito citostático já na menor concentração e citocida na mais elevada. Para a linhagem de cólon o EBAE produziu inibição de crescimento na concentração de 25 µg/mL e morte celular com 250 µg/mL. Para as demais linhagens, o EBAE apresentou efeito citostático ou citocida somente na concentração mais elevada. Este resultado aponta para a presença de substâncias com mecanismo de ação antitumoral independente da atividade antiinflamatória.

Para avaliação da atividade antinociceptiva, os extratos brutos de *P. reticulata* foram testados em modelos de algesia induzida por estímulo químico e térmico. No teste de algesia induzida por ácido acético, apenas os extratos brutos hidroalcoólicos reduziram o número de contorções abdominais, com inibição de nocicepção segundo perfil semelhante ao da indometacina. Além disso, o EBHF foi efetivo

de maneira dose-dependente. No teste de algesia induzida por calor, o EBHF de *P. reticulata* aumentou o tempo de reação dos animais 60 e 90 minutos após sua administração por via intraperitoneal, utilizando-se a morfina como controle positivo.

O teste da formalina foi utilizado com o objetivo de melhor caracterizar a atividade antinociceptiva do extrato bruto (EBHF) de *P. reticulata*. Neste modelo, o pré tratamento pela via oral com o EBHF reduziu a dor neurogênica e a inflamatória induzidas pela formalina. A indometacina, anti-inflamatório não esteroide e controle positivo do teste, reduziu apenas a dor de origem inflamatória. Como o EBHF apresentou atividade antinociceptiva sobre a primeira fase de dor induzida pela formalina, testou-se sua atividade no modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina. A administração oral prévia do EBHF reduziu a resposta álgica induzida pela capsaicina de maneira semelhante à morfina, um analgésico opióide utilizado como controle positivo do teste.

Utilizando ainda o teste das contorções abdominais para estudo do provável mecanismo de ação antinociceptivo do EBHF, foi verificado que o pré-tratamento com naloxona, um clássico antagonista de receptor opióide, não modificou a atividade do EBHF, quando comparado à morfina. Em condições experimentais semelhantes, a administração prévia de naloxona quaternária, um antagonista opióide periférico, bloqueou o efeito antinociceptivo do EBHF. Estes dados sugerem uma possível ação periférica na atividade antinociceptiva do EBHF.

Introdução

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas por povos de várias civilizações há mais de 5 mil anos. Os egípcios documentaram em papiros o uso de aproximadamente 700 drogas. No período Védico da Índia, 1000 anos a.C, foram registradas mais de 1000 ervas, muitas delas ainda em uso pela medicina Ayurvedica (Cordell, 1993; Phillipson, 2001).

A investigação de espécies vegetais, utilizadas popularmente durante séculos de uso medicinal empírico, resultou em alguns avanços terapêuticos. No fim do século XIX e início do século XX foram isolados os primeiros compostos de produtos vegetais, incluindo alcalóides como morfina, estricnina e quinina (Hamburger e col, 1991; Phillipson, 2001). Atualmente estima-se que substâncias derivadas de plantas constituem aproximadamente 25% do receituário médico nos países industrializados, sendo que 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e os 25% restantes referem-se às outras fontes de produtos naturais (minerais, microbiológicos, entre outros) (Cragg e col, 1997; Carvalho, 2001; Rates, 2001).

De acordo com os dados presentes no Relatório da Organização Mundial da Saúde (1995), grande parte da população dos países em desenvolvimento fazem uso rotineiro das plantas medicinais nativas no cuidado primário à saúde (Cragg e col, 1999). É estimada a presença de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores em todo o mundo. Entretanto, dados disponíveis revelam que apenas 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Hamburger e col, 1991; Cragg e col, 1999). Portanto, as espécies vegetais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas como drogas convencionais no futuro (Rates, 2001).

O processo de estudo de uma planta é longo e multidisciplinar, envolvendo botânicos, químicos, farmacognostas, agrônomos, médicos, farmacêuticos, farmacólogos, toxicólogos, administradores, publicitários e advogados. Este estudo inicia-se com a seleção da espécie, sendo esta uma etapa crucial no sucesso da investigação. A escolha pode ser baseada em considerações quimiotaxonômicas ou em informações etnofarmacológicas. As espécies selecionadas pelo uso na medicina popular apresentam grande chance de conter compostos biologicamente ativos. Segundo alguns autores, existe uma estreita correlação entre a atividade anticancerígena e plantas usadas pela medicina popular com esta finalidade (Hamburger e col, 1991; Chang, 2000).

O aperfeiçoamento dos processos de purificação e isolamento aliados às técnicas de espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta e infra-vermelho e ressonância magnética nuclear têm possibilitado a elucidação de estruturas moleculares complexas de constituintes naturais (Calixto, 2000; Chang, 2000, Rates, 2001). Além disso, o desenvolvimento de métodos de manejo, cultivo e melhoramento genético representam uma nova tendência no estudo de plantas medicinais, pois asseguram maior qualidade e eficácia aliadas à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (Calixto, 2000).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente. Várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisas nesta área (Calixto, 2000). É importante salientar que, na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo mantinham qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais e atualmente, pelo menos metade delas introduziram este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (Fellows, 1992, Calixto, 2000).

Diversos fatores colaboram para esse aumento de interesse: estudos sobre a diversidade e preservação das espécies, acesso restrito da maioria da população aos medicamentos modernos, fazendo com que as vias alternativas mais baratas sejam oferecidas (Hamburger e col, 1991; Cragg e col, 1999, Calixto, 2000). Por outro lado, a falta de informação e o mau uso dos medicamentos geralmente provocam o aparecimento de efeitos colaterais graves ou então o insucesso do tratamento, causando descrença em sua eficácia. Acompanhando esses fatos, o ressurgimento de práticas alternativas (cromoterapia, florais, homeopatia, medicina chinesa, medicina ayurveda e outros) de eficácia duvidosa, muitas vezes prometem milagres sem ocorrência de efeitos colaterais, colaborando com a disseminação da falsa crença na absoluta segurança dos produtos naturais (Carvalho, 2001; Calixto, 2000).

O retorno aos estudos das espécies vegetais deve-se também à grande eficácia clínica de algumas substâncias antitumorais obtidas de plantas, como os alcalóides da vinca, extraídos da *Catharanthus roseus* e os taxóides extraídos de *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata*. O NCI (Nacional Cancer Institute, EUA) tem avaliado mais de 50 000 amostras de plantas em testes de atividade anti-HIV e 33 000 amostras para atividade antitumoral (Rates, 2001). Estudos recentes revelaram novos princípios vegetais com atividade antiproliferativa. Entre eles, substâncias isoladas da *Cephalotaxus harringtonia* e de espécies da família *Apocynaceae* têm mostrado eficácia contra leucemias e câncer de mama, respectivamente (Cragg, 1999). Outro aspecto importante é a obtenção de compostos que, apesar de apresentarem potencial terapêutico limitado, podem ser utilizados como matéria prima inicial para a obtenção de produtos semi-sintéticos com atividade farmacológica mais pronunciada (Rates, 2001). Como exemplo, pode ser citado o desenvolvimento do atracúrio a partir dos alcalóides do curare, obtidos de *Chondrodendron tomentosum* e dos anestésicos locais a partir da cocaína (Waigh, 1988).

O Cerrado compreende 25% do território brasileiro e caracteriza-se pela baixa fertilidade do solo e predomínio de uma longa estação seca, que condicionam o desenvolvimento de um tipo peculiar de vegetação, muito atraente pela riqueza em espécies medicinais e pela beleza dos aspectos estéticos que apresenta (Ferri, 1969).

A viabilidade do potencial medicinal das espécies do Cerrado passa, em primeiro plano, pelo processo de resgate de informações, identificação das espécies existentes e sua disponibilidade para pesquisa. A partir do conhecimento empírico tradicional destes vegetais, descobertas benéficas à medicina têm sido feitas. Mors e col (1966) detectaram uma ação profilática do óleo dos frutos de *Pterodon pubescens* no combate a infecção de cercárias de *Schistosoma mansoni*. Outro exemplo são as furanocumarinas obtidas da *Brosimum gaudichaudii*, utilizadas no tratamento do vitiligo (Pozetti & Bernardi, 1971).

Alvo de estudo deste projeto, a *Plathymenia reticulata* Benth. (Leguminosae) é conhecida vulgarmente como vinhático e distribui-se em diversas regiões do Cerrado brasileiro. As espécies desse gênero apresentam folhas bipinadas, flores pequenas dispostas em espigas cilíndricas, frutos em vagens e sementes aladas. O vinhático é muito apreciado por sua madeira bonita, de cor amarela, durável e fácil de trabalhar, sendo muito utilizada na marcenaria (Pio Corrêa, 1969).

A infusão em água fria da entrecasca obtida do caule desta árvore é utilizada popularmente no tratamento de diversos processos inflamatórios. Estudos químicos realizados com o gênero *Plathymenia* indicam a presença de ésteres diterpênicos (metil vinhaticoato e acetato de vinhaticil) como sendo as principais substâncias isoladas do extrato hexânico da madeira. Foi detectada também a presença de 6:7:3'4'-Tetrahidroxiflavona (Plathymenin) e 2:4:5:3':4'-Pentahidroxichalcona

(Neoplathymenin) (King e col 1953; Matos e col 1984). Não existem registros relacionando estes constituintes com a provável ação antiinflamatória de *Plathymenia reticulata*.

Revisão Bibliográfica

Inflamação e Dor

A inflamação é uma resposta complexa a estímulos exógenos e endógenos que são capazes de gerar agressão celular. A resposta geralmente é acompanhada de sinais e sintomas clínicos como calor, rubor, edema e dor. Calor e rubor estão relacionados com o aumento do fluxo sanguíneo local e o edema com o aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular (Guallilo e col, 2000).

A percepção da dor envolve a participação de mecanismos periféricos ou centrais, dependentes da intensificação da transmissão no corno dorsal da medula e vias sensitivas superiores. O sistema nociceptivo periférico é formado por nociceptores polimodais e os estímulos são propagados através de fibras aferentes primárias C ou fibras A- δ . (Carr e col, 1999; Foxwell e col, 2001). A dor que acompanha o processo inflamatório resulta, provavelmente da sensibilização de nociceptores produzida por alterações físicas como pressão decorrente da formação de edema, alterações químicas como a síntese de prostaglandinas, serotonina, bradicinina e aminoácidos excitatórios e alterações imunológicas com a participação de citocinas (Carr e col, 1999).

A reação inflamatória consiste em reações inatas e em reações imunologicamente específicas. A maior função do sistema imune é proteger o hospedeiro da invasão de patógenos (Laskin e col, 2001). As reações inatas podem ser divididas em eventos vasculares e em eventos celulares.

Durante os eventos vasculares são gerados mediadores químicos pelas células, sendo que esses mediadores regulam os eventos vasculares e celulares (Sim, 1994). Os eventos vasculares envolvem uma vasodilatação arteriolar que aumenta o fluxo sanguíneo no tecido inflamado e a exsudação de líquido (edema), através da ação de agentes que elevam a permeabilidade vascular, como as

prostaglandinas, bradicinina, histamina e fator de ativação plaquetária (PAF) (Vane e col, 1998). Esse exsudato líquido contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos. Estes incluem os componentes das cascatas enzimáticas dos sistemas complemento, fibrinolítico e de coagulação (Coltren, 1992). A ativação da cascata do sistema complemento por microorganismos gera componentes (C1 a C9) que promovem a liberação de mediadores inflamatórios de mastócitos e/ou fatores quimiotáticos para leucócitos facilitando também a fagocitose (Okabe e col., 2000; Monsinjon e col., 2001).

A resposta imunologicamente mediada torna a resposta defensiva ao hospedeiro não apenas mais eficaz, como também mais específica ao patógeno invasor: os linfócitos B para produção de anticorpos e os linfócitos T são importantes na indução da resposta imune (Roitt, 1994). Os linfócitos representam a primeira linha da defesa imunológica, em resposta ao dano tecidual. Essas células migram ao lugar da injúria e iniciam a resposta inflamatória. Quando adequadamente orquestrada, esta resposta leva à destruição do patógeno invasor e reparo tecidual; quando não, a resposta inflamatória torna-se crônica (Laskin e col, 2001).

Os principais mediadores químicos que participam do processo inflamatório são:

1) Histamina

A histamina é uma amina básica, a 2-(4-imidazolil)-etilamina, sintetizada a partir da histidina pela L-histidina descarboxilase, e encontrada em mastócitos, basófilos e plaquetas (Hebert e col, 2001). É liberada por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas com a participação de componentes do sistema complemento (C3a e C5a), IgE, citocinas (IL-1 e IL-8) e neuropeptídeos (substância P)

(Schwartz, 1994; Schaefer e col, 1998; Okabe e col, 2000). A substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina liberados por neurônios aferentes promovem a inflamação em virtude de seus efeitos sobre os vasos sanguíneos além de induzir a degranulação dos mastócitos, liberando mediadores químicos e também induzindo a infiltração de granulócitos (Okabe e col., 2000). Esse mecanismo conhecido como inflamação neurogênica atua no sentido de amplificar e manter a reação inflamatória, bem como a ativação das fibras aferentes nociceptivas.

A histamina desempenha um importante papel na resposta inflamatória aguda. Seus efeitos são produzidos através da ligação a receptores histamínicos específicos associados à proteína G e distinguidos através de antagonistas seletivos (Schaefer e col, 1998, Backker e col, 2000). Os receptores H_1 localizam-se nas células endoteliais e na musculatura lisa vascular e sua estimulação leva à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e aumento da adesão de neutrófilos ao endotélio (Schaefer e col, 1998; Nakahara e col, 2000). Estudos sugerem que a histamina pode também contribuir na nocicepção provavelmente através de receptores H_1 , presentes em neurônios aferentes primários (Hebert e col, 2001). Os efeitos da histamina no relaxamento vascular são complementados pela produção de óxido nítrico e participação do receptor H_2 associado às células musculares lisas (Jansen-Olesen, 1997). A histamina também estimula a secreção ácida gástrica por sua ação sobre os receptores H_2 (Norlen e col, 2000). Os receptores H_3 aparentemente estão localizados no sistema nervoso central e periférico (Tozer e col, 1999).

2) *Cininas*

As cininas (bradicinina e calidina), são formadas respectivamente na corrente sanguínea e em diversos tecidos a partir de substratos protéicos endógenos, os cininogênios, pela ação da calicreína protease

(Medeiros e col, 2001). São liberadas por lesão tissular, reações alérgicas, infecções virais e participam da resposta inflamatória e da hiperalgesia através da interação com receptores B₁ e B₂ (Calixto e col, 2000).

O receptor B₂ é amplamente distribuído nos tecidos periféricos e central, é constitutivo e medeia a maioria de efeitos fisiológicos das cininas, sendo a bradicinina o ligante de maior afinidade (Medeiros e col, 2001). Com apenas algumas exceções, o receptor B₁ não é expresso em nível significativo em tecidos normais, mas sua indução ocorre rapidamente em condições patológicas ou pela ação de agentes pró-inflamatórios como citocinas ou lipopolissacarídeos (Medeiros e col, 2001).

A ativação destes receptores promove vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular através da liberação de histamina, prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂), citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e radicais livres de diversas células (Calixto e col, 2000).

A hiperalgesia induzida pela bradicinina é, em parte, dependente da interação com receptores B₁ e envolve também a liberação de mediadores inflamatórios de macrófagos e leucócitos. Por outro lado, receptores B₂ acoplados à proteína G são encontrados em neurônios sensitivos e induzem a ativação da fosfolipase C, gerando os segundos mensageiros inositol-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que por sua vez ativam a proteína quinase C (PKC). A PKC é responsável pela hiperexcitabilidade produzida pela bradicinina nas fibras sensitivas aferentes (Calixto e col, 2000).

3) Sistema Complemento

Os componentes do sistema complemento estão presentes no plasma sob a forma inativa, sendo a ativação do componente C₃ a etapa fundamental para o desempenho das funções biológicas do

complemento. Esta ativação é resultado de um conjunto de condições patológicas que incluem doenças auto-imunes, ataques microbianos e enzimas proteolíticas presentes no exsudato inflamatório. A clivagem do C₃ gera dois fragmentos denominados C_{3a} e C_{3b}. O C_{3b} forma a C₅ convertase que, interagindo com o C₅ libera o C_{5a} (Kilgore, e col, 1998; Jagels e col, 2000; Monsinjon e col, 2001).

Tais peptídeos bioativos são responsáveis por diversos eventos da resposta inflamatória aguda. A fração C_{3a} do complemento aumenta a permeabilidade vascular e promove vasodilatação por liberar histamina de mastócitos, além de atuar como opsonina favorecendo a fagocitose de bactérias por neutrófilos e macrófagos (Lima, 1994; Monsinjon e col, 2001). O componente C_{5a} é um poderoso agente quimiotático para neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos. Além disso, contribui para a adesão leucocitária ao endotélio através da regulação de P-selectina e β_2 integrina. O C_{5a} ativa também a via lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em neutrófilos e monócitos, intensificando a liberação de mediadores inflamatórios (Jagels e col, 2000).

4) Citocinas

As citocinas são polipeptídeos que exercem seus efeitos em baixas concentrações e são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos T e B ativados. Os efeitos produzidos por essas substâncias dependem do tempo e do local onde são liberadas, da presença de elementos agonistas ou antagonistas e do receptor de superfície celular. Uma vez ligadas a receptores específicos iniciam suas ações que incluem a síntese de outras citocinas (Mayers e col, 1998; Opal e col, 2000).

Na fase inicial da resposta inflamatória, caracterizada pela infiltração leucocitária, várias citocinas são produzidas por neutrófilos, entre elas: fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1 β , IL-8 e IL-1receptor antagonist) (Matsukawa e col, 1999).

O efeito mais importante das citocinas na inflamação é sobre o endotélio através da síntese de moléculas de adesão, do óxido nítrico e de eicosanóides. A interleucina 1 (IL-1) e o TNF induzem ainda respostas sistêmicas de fase aguda gerando hipertermia (Dworski e col, 1997). A IL-8, induzida por IL-1 e TNF - α está envolvida na quimiotaxia para neutrófilos (Matsukawa e col, 1999). A IL-1ra (IL-1receptor antagonist) é uma citocina inflamatória produzida por monócitos e macrófagos que inibe especificamente IL-1 α e IL-1 β . Estas citocinas inibitórias desempenham um papel importante no controle de várias condições clínicas caracterizadas por uma resposta inflamatória exacerbada, como na artrite reumatóide. Outras citocinas antiinflamatórias incluem IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e são capazes de limitar a produção de prostaglandinas e a hiperalgesia produzida principalmente por TNF- α e IL-1 β (Opal e col, 2000; Ribeiro e col, 2000).

5) Fator de Agregação Plaquetária (PAF)

O PAF é sintetizado a partir de fosfolípidos de membrana por ativação de fosfolipases (PLA₂) em consequência da liberação de histaminas, trombinas e leucotrieno B₄ (Yedgar e col, 2000). Além de ser um potente vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular por contração das células endoteliais, estimula a agregação plaquetária, promove a liberação de tromboxano A₂ e do conteúdo granular plaquetário e ainda estimula as enzimas lisossômicas para produção de superóxidos (Kilgore e col, 1998; Tiemann e col, 2001).

6) *Óxido Nítrico (NO)*

A função fisiológica do NO foi descoberta originalmente na circulação ao demonstrar-se que o fator relaxante derivado do endotélio podia ser explicado quantitativamente pela formação de NO pelas células endoteliais (Janero, 2000). Desde então, um grande número de estudos experimentais sugerem a importância do NO na função cardiovascular (Goumas e col., 2001).

O óxido nítrico é um mediador inflamatório sintetizado a partir da L-arginina, do oxigênio molecular e do NADPH através de reações catalisadas por uma família de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintase (NOS) (Janero, 2000). Existem três isoformas de NOS, sendo duas formas constitutivas (NOS_c) expressas no endotélio (NOS_e) e a nível neuronal (NOS_n), dependentes de cálcio e de calmodulina e uma terceira isoforma induzível (NOS_i), cálcio/calmodulina independente (Dolan e col, 2000; Goumas e col., 2001).

A formação de NO influencia várias classes de biomoléculas, resultando na ativação de guanilato-ciclase e formação de segundos mensageiros intracelulares. Através de uma cascata de quinases, o aumento na concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPC) promove o relaxamento de células endoteliais e conseqüentemente produz vasodilatação. Acredita-se que histamina e bradicinina induzem a liberação de NO, contribuindo com os efeitos sobre o endotélio vascular (Patel e col, 1999).

O NO e prostaglandinas podem ser produzidos também pela ativação do aminoácido N-metil-D-aspartato (NMDA), um receptor para glutamato. Juntamente com suas enzimas (principalmente NOS_n e COX-2), estes mediadores desempenham um importante papel na indução e manutenção da hiperalgesia gerada por processos inflamatórios (Dolan e col, 2000). O óxido nítrico pode ainda limitar

a proliferação celular através de uma ação citostática reversível, promovendo a apoptose e agindo como uma citotoxina inespecífica (Janero, 2000).

Outro papel importante atribuído ao óxido nítrico é a prevenção e reparação de danos ao trato gastrointestinal, promovendo a secreção de muco e bicarbonato e regulando o fluxo sanguíneo a nível de mucosa, complementando o papel citoprotetor das prostaglandinas (Janero, 2000).

Por este motivo, o NO tem sido considerado um candidato terapêutico para a redução dos distúrbios gastrointestinais provocado pelo uso crônico dos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (FAINES). Estudos recentes revelam que a administração oral conjunta de doadores de NO com o piroxicam reduzem a extensão dos efeitos tóxicos à mucosa gástrica sem alterar suas propriedades farmacocinéticas e analgésicas (Janero, 2000).

7) *Eicosanóides*

O ácido araquidônico, normalmente encontrado esterificado nos fosfolípidios de membrana é liberado mediante a ativação de fosfolipases celulares (PLA₂) e dá origem a diversos eicosanóides que desempenham papéis fundamentais no processo inflamatório (Yedgar e col, 2000). O ácido araquidônico livre é então convertido em prostaglandinas como PGG₂ e PGH₂ através da via ciclooxigenase (COX). A PGH₂ é um substrato comum para a formação de uma grande variedade de prostanóides, que incluem PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI (prostaciclina) e TXA₂ (tromboxano), sendo produzidos por células endoteliais, leucócitos, plaquetas e mastócitos (Kam e col, 2000; Colville e col, 2000).

As prostaglandinas exercem sua ação através da ligação a receptores de superfície celular mediados pela proteína G e por AMPc. São responsáveis por vários efeitos biológicos: a PGE₂ promove vasodilatação, citoproteção da mucosa gástrica além de aumentar a atividade álgica da bradicinina e estimular a produção de esteróides pela supra-renal, liberando corticóides que participam do processo inflamatório. Nas plaquetas, a transformação do ácido araquidônico em TXA₂ desencadeia a agregação plaquetária e vasoconstrição. A PGI₂ (prostaciclina), produzida na parede vascular promove vasodilatação e é um potente inibidor da agregação plaquetária (Cirino, 1998; Kam e col, 2000).

Um dos principais caminhos da oxidação enzimática do ácido araquidônico envolve a inserção do oxigênio molecular no carbono 5 catalisada pela enzima 5-lipoxigenase, levando a formação do eicosanóide 5-hidroxiperoxieicosatetraenóico (5-HpETE), finalmente metabolizado em leucotrienos. O leucotrieno A₄ é transformado em LTB₄ através da LTA₄ hidrolase que catalisa a adição de água no LTA₄. O LTB₄ é precursor de uma importante classe de leucotrienos contendo cisteinil: LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (cisteinil-leucotrienos). Estes cisteinil leucotrienos são conhecidos como “substâncias de reação lenta da anafilaxia” (geradas no pulmão durante a anafilaxia) e são sintetizados por células inflamatórias como os eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, causando contração do músculo liso. Além disso funcionam como mediadores de reação de hipersensibilidade aguda, incluindo asma (Hevko e col, 2001).

O leucotrieno B₄ é um potente quimiotático de leucócitos polimorfonucleares, promovendo a aderência de neutrófilos (Oketani e col, 2001). A habilidade dos leucócitos polimorfonucleares de se aderirem ao endotélio é mediada por várias moléculas de adesão, como as selectinas, presentes no tecido endotelial (Belch e col, 2000). Além de poderosos agentes quimiotáticos, os leucotrienos aumentam a

permeabilidade vascular, produzem vasodilatação e contração da musculatura lisa intestinal e brônquica (Lima, 1994; Kam e col, 2000).

Vane, em 1971, demonstrou que os fármacos antiinflamatórios não esteroidais (FAINEs) produzem seu efeito terapêutico através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) e, conseqüentemente, da síntese de prostaglandinas. Este fato desencadeou um crescente interesse no mecanismo de ação fisiológico e patológico desta enzima e atualmente o desenvolvimento de técnicas de pesquisa nesta área tem conseguido elucidar novos aspectos que abrangem a resposta inflamatória (Vane e col, 1998; Colville e col, 2000).

A ciclooxigenase apresenta duas isoformas: a COX-1 é uma enzima constitutiva e expressa em vários tecidos, produzindo níveis baixos de prostaglandinas responsáveis pela regulação da função gástrica e renal, ativação plaquetária e manutenção da homeostase vascular; a COX-2 é uma isoforma induzida em resposta a estímulos que incluem lipopolissacarídeos, citocinas (IL-1, TNF), interferons e fator ativador de plaquetas (FAP), contribuindo também para a hiperalgesia e expansão do processo inflamatório (Vane e col, 1998; Kam e col, 2000; Ochi e col, 2000; Brooks e col, 2000; Sjö Dahl, 2001). Esta distinção entre as duas isoformas da COX apresenta algumas exceções, pois COX-1 pode ser induzida sob certas condições e a COX-2 é constitutivamente expressa em células de tecido cerebral, traquéia e rins (Langerbach e col, 2000; Sjö Dahl, 2001).

Estudos recentes apontam para a provável existência de uma terceira isoforma, a COX-3, alvo de ação do paracetamol, que tem atividade analgésica e antipirética com pouca ação antiinflamatória (Vane e col, 1998; Botting e col, 2000).

Os FAINES são amplamente utilizados em todo mundo por sua eficácia terapêutica no combate à inflamação e dor. Aproximadamente 70 milhões de prescrições médicas para utilização destas drogas são produzidas nos Estados Unidos, excluindo-se nesta estimativa os medicamentos vendidos em consequência da auto-medicação (Amann e col, 2000; Hawkins e col, 2000).

Entretanto, os FAINES são também conhecidos por seus efeitos adversos que incluem danos ao trato gastrointestinal e à circulação renal. A inibição da COX-1 bloqueia as prostaglandinas (PGE₂ e PGI₂) responsáveis por controlar a secreção ácida gástrica e secreção de muco e bicarbonato (Hawkins e col, 2000; Whelton e col, 2001). Além disso, a diminuição na produção de prostaglandinas aumenta a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular devido ao aumento na síntese de leucotrienos, promovendo obstrução do fluxo sanguíneo e tornando a mucosa gástrica susceptível ao ataque de radicais livres gerados por neutrófilos ativados (Hawkins e col, 2000; Whelton e col, 2001).

Alguns FAINES causam ainda danos à mucosa gástrica através de um efeito local. Drogas ácidas como a aspirina tornam-se lipossolúveis em baixo pH. Administradas oralmente, podem atravessar a barreira lipídica de células da mucosa gástrica. No pH intracelular perdem a lipossolubilidade e ficam retidas, desorganizando a função celular provavelmente por inibir a fosforilação oxidativa mitocondrial. As células tornam-se então sensíveis ao ataque ácido (Hawkins e col, 2000).

Nos últimos anos, várias pesquisas estão direcionadas para o desenvolvimento de uma nova categoria de medicamentos - os inibidores seletivos da COX-2, que possam diminuir os efeitos colaterais que limitam o uso de FAINES convencionais, como a aspirina, diclofenaco, piroxicam, naproxeno e ibuprofeno (Willoughby e col, 2000). O meloxicam, que parece inibir preferencialmente a COX-2 é considerado um potente antiinflamatório causando menores danos à mucosa gástrica (Engelhardt e col,

1996; Vane e col, 1998; Hawkins e col, 2000). Outros inibidores específicos para COX-2 (celecoxib, rofecoxib) administrados a pacientes com osteoartrite ou artrite reumatóide em testes clínicos têm se mostrado eficazes com menor incidência de efeitos colaterais no trato gastrointestinal (Hawkins e col, 2000; Brooks e col, 2000; Kam e col, 2000).

Os inibidores de COX-2 têm sido avaliados também quanto ao seu potencial antiproliferativo em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Esta enzima encontra-se presente em células neoplásicas bem como na neovasculatura de alguns tumores humanos, entre eles mama, cólon, próstata e fígado (Zimmermann e col, 1999; Liu e col, 2000; Sjö Dahl, 2001). Vários trabalhos têm demonstrado a participação da aspirina, um antiinflamatório não esteroideal inibidor da ciclooxigenase, na redução dos riscos de câncer de cólon intestinal (Masferrer e col, 2000).

As primeiras evidências que os eicosanóides pudessem participar no desenvolvimento do câncer de próstata, concentraram-se em dados epidemiológicos entre o alto consumo de carne vermelha e o risco em desenvolver esse tipo de câncer. Produtos de origem animal contêm ácido araquidônico ao contrário dos de origem vegetal (Myers e col, 2001). O ácido 12-hidroxi-tetraeicosanoico (12-HETE), 5-HETE e PGE₂, eicosanóides formados a partir do ácido araquidônico parecem possuir um papel importante na biologia do câncer de próstata. (Myers e col, 2001).

Estudos realizados em células de tumor coloretal demonstraram que a COX-2 é responsável pelo aumento nas concentrações de prostaglandinas, principalmente PGE₂. O provável mecanismo de ação dos inibidores de COX-2 seria então, promover a apoptose celular através do bloqueio da produção de PGE₂, mediador inflamatório com importante papel no crescimento e manutenção de tumores, por

induzir a angiogênese necessária para o suprimento de oxigênio e nutrientes de células neoplásicas (Masferrer e col, 2000; Liu e col, 2000; Sjö Dahl, 2001).

Objetivos

Tendo em vista a utilização popular das cascas de *P. reticulata* e as poucas referências bibliográficas relacionadas à sua provável ação medicinal, o presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a atividade farmacológica dos extratos brutos obtidos da entrecasca de *Plathymenia reticulata* em modelos experimentais de inflamação, câncer e algesia.
- Determinar as frações ativas e identificar os grupos químicos presentes nos extratos.

*Materiais e
Métodos*

MATERIAIS

1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A entrecasca do caule de *Plathymenia reticulata* foi coletada de espécies encontradas no município de Senador Canedo, Estado de Goiás (figura 1) e amostras da planta foram identificadas pelos professores Heleno Dias Ferreira e Lourdes Cardozo Laureano. Uma exsicata de *P. reticulata* está depositada no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob número 22. 973.

A entrecasca do caule da *Plathymenia reticulata* foi seca em estufa ventilada a 40°C (Fabbe). Após secagem, o material vegetal foi pulverizado através do uso de moinho de facas (MR030) e posteriormente armazenado em sacos plásticos sob vácuo.



Figura 1: Exemplar de *Plathymenia reticulata* Benth. coletada no município de Senador Canedo, Estado de Goiás

2. MATERIAL QUÍMICO

2.1 Drogas

Carragenina (tipo IV); dexametasona; indometacina (Sigma Chem. Co. – USA); morfina; (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda); heparina (Liquemine – Roche, Brasil); hidrocloreto de naloxona, naloxona methiodide, hidrocloreto de loperamida (Sigma Chem. Co. – USA).

Todas as drogas foram solubilizadas em solução salina (NaCl 0,9%). Na dissolução da indometacina e morfina usou-se 0,5% de tween 80.

2.2 Solventes e Reagentes

Álcool etílico absoluto, formaldeído, tween 80, cloreto de sódio, cloreto de mercúrio, cloreto de potássio, hidróxido de sódio, fosfato monobásico de potássio, sulfato de sódio anidro (Labsynth – Brasil); ácido acético glacial, ácido clorídrico, anidrido acético, diclorometano, acetato de etila, fosfato monobásico de sódio (Merck – Alemanha); sulforrodamina B; tampão tris base (Sigma Chem Co – USA); éter etílico (Nuclear); acetona, ácido sulfúrico (Chemco); óleo de cróton (Botica Veado d'ouro); hidróxido de amônio (Cinética Química Ltda); iodeto de potássio (Qeel Indústrias Químicas Ltda); reagente de Liebermann-Burchard (1 mL de anidrido acético e 3-4 gotas de ácido sulfúrico); reagente de Mayer (1,35 g de cloreto de mercúrio em 60 mL de água; 5 g de iodeto de potássio em 20 mL de água. Misturar as duas soluções completando o volume para 100 mL com água).

3. LINHAGENS CELULARES

As células utilizadas neste trabalho são originárias de neoplasias humanas e foram cedidas ao CPQBA pelo “National Cancer Institute” (NCI - USA) (Tabela 1). As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² (Nunc[®]), com 5 mL de meio RPMI (Gibco[®]) suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB), incubadas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 100% de umidade.

Tabela 1: Linhagens celulares tumorais humanas utilizada na triagem do efeito antiproliferativo.

Tipo celular	Nome
Pulmão	NCI-460
Mama	MCF 7
Mama	NCI-ADR *
Melanoma	UACC-62
Ovário	OVCAR-03
Cólon	HT-29
Prostata	PC-03
Renal	786-0

*linhagem celular que expressa o fenótipo de resistência a múltiplas drogas.

4. ANIMAIS

Os animais foram adquiridos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20\pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (150-180g) e camundongos albinos Swiss machos, adultos (25-35g) aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais submetidos a jejum de 12 horas.

MÉTODOS

1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

1.1 Obtenção dos Extratos Brutos de *Plathymenia reticulata*

1.1.2 Extrato bruto hidroalcoólico obtido por extração a frio

O pó da entrecasca de *Plathymenia reticulata* (200g) em 350 mL de álcool etílico a 70 % foi submetido à maceração dinâmica durante 4 horas. Após filtração a vácuo, o resíduo foi retomado em 350 mL do solvente para um novo período de 4 horas de extração. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo que ao final das 12 horas os volumes resultantes das extrações foram reunidos e concentrados sob vácuo até a remoção do etanol. O volume restante foi liofilizado (Liofilizador modelo Virtis BT

8XL) fornecendo 73,7 g (37% de rendimento) de um resíduo denominado extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF).

1.1.3 Extrato bruto hidroalcoólico obtido por extração a quente

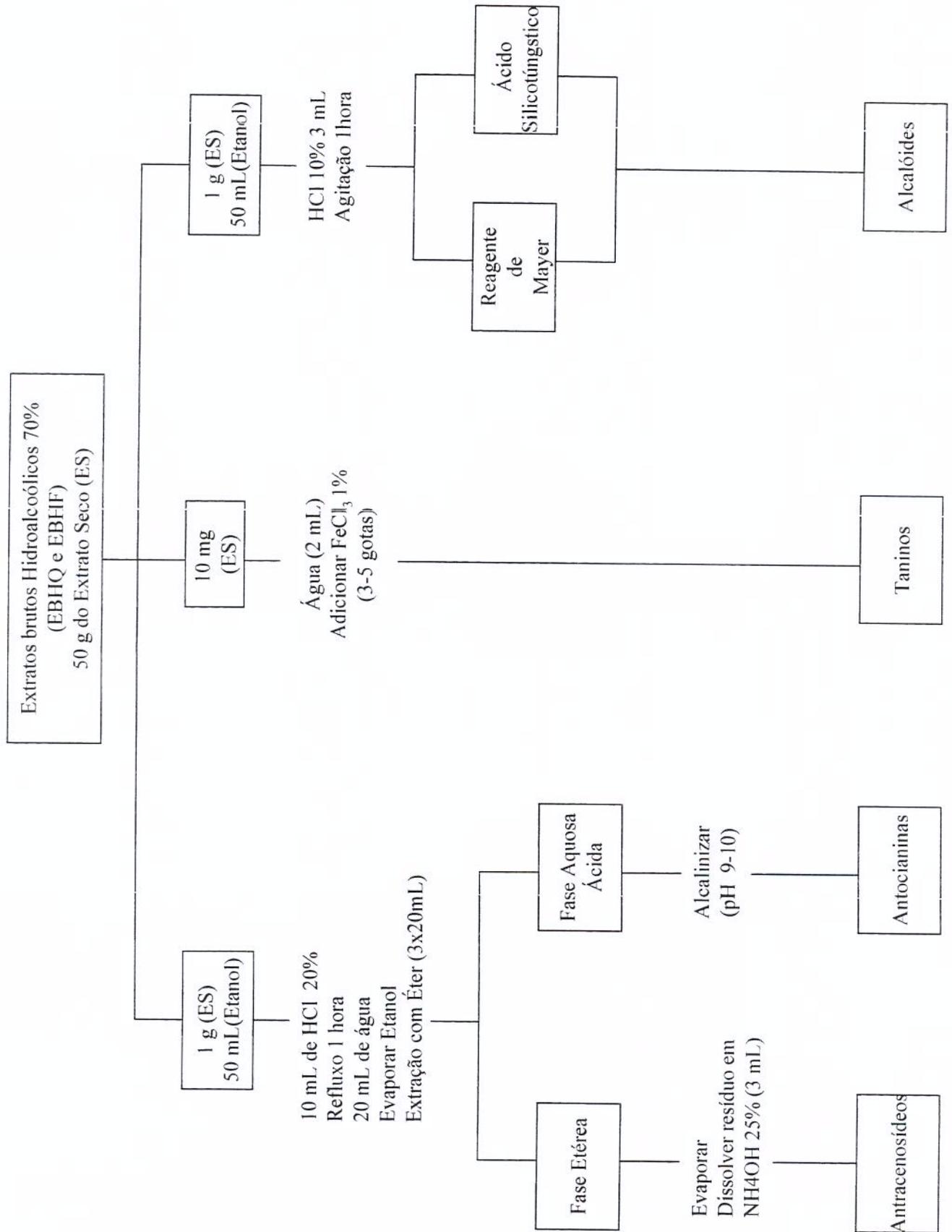
O pó da entrecasca de *Plathymenia reticulata* (200g) foi extraído a 70°C em 350 mL de álcool etílico a 70 %, através de aquecimento em balão de vidro acoplado a um condensador de refluxo por duas horas. Após filtração, o resíduo foi retomado em 350 mL do solvente para um novo período de duas horas de extração. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, sendo que no final deste período os volumes resultantes das extrações foram reunidos e concentrados sob vácuo até a remoção do etanol. O volume restante foi liofilizado (Liofilizador modelo Virtis BT 8XL) fornecendo 96,4 g (46% de rendimento) de um resíduo denominado extrato bruto hidroalcoólico a quente (EBHQ).

1.1.4 Extrato bruto Acetato de Etila

O pó da entrecasca de *Plathymenia reticulata* (250g) foi extraído com acetato de etila (500 mL) em aparelho Soxhlet até esgotar o material vegetal. O solvente orgânico foi eliminado sob vácuo até a remoção do acetato de etila, fornecendo 2,0 g (0,8% de rendimento) de um resíduo denominado extrato bruto acetato de etila (EBAE).

1.2 Triagem fitoquímica

Os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) obtidos entrecasca de *Plathymenia reticulata* foram analisados segundo metodologia descrita na figura 2.



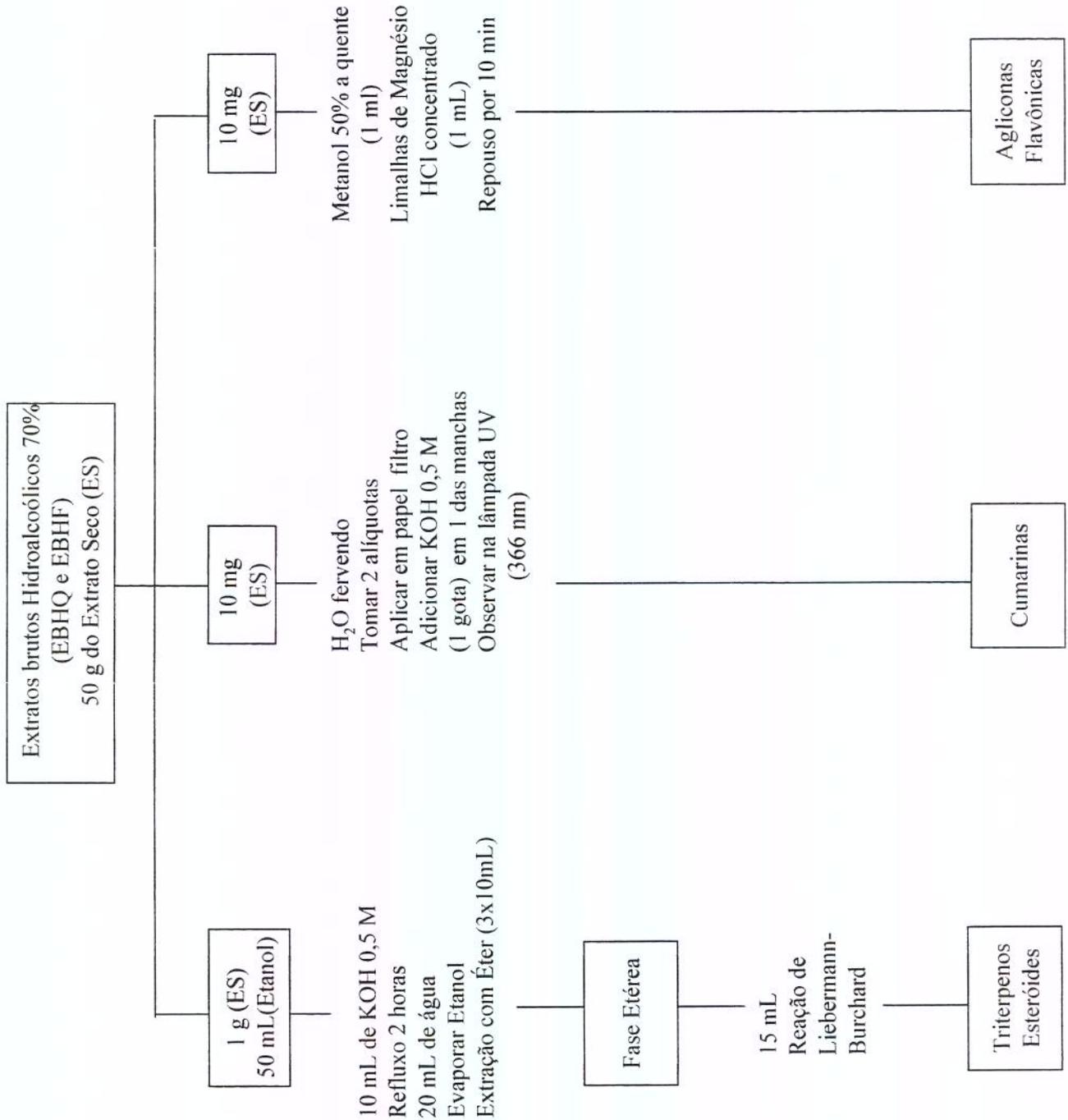


Figura 2: Triagem Fitoquímica para verificação dos principais grupos químicos presentes nos extratos hidroalcoólicos de *Plathymania reticulata*.

1.3 Fracionamento do Extrato Bruto Hidroalcoólico a Frio (EBHF)

1.3.1 Isolamento da fração básica

O extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) de *Plathymenia reticulata* (30 g) foi dissolvido em 500 mL de acetato de etila e extraído com HCl 1N (200 mL; 3x) . As fases aquosas combinadas foram ajustadas a pH 14 com NaOH 4N. A fração básica foi extraída com acetato de etila (3x 200 mL). A fase orgânica foi concentrada sob vácuo fornecendo um resíduo denominado fração básica (FB : 350 mg : 1,17% de rendimento)

1.3.2 Isolamento da fração neutra

A fase orgânica livre de bases foi extraída com NaOH 1N (200mL;3x). A fase orgânica combinada foi filtrada em Na₂SO₄ anidro e concentrada sob vácuo, fornecendo 482 mg (1,67% de rendimento) de um resíduo denominado fração neutra (FN).

1.2.3 Isolamento da fração ácida

A fase orgânica livre de bases foi extraída com NaOH 1N (200 mL;3x). As fases aquosas foram combinadas e ajustadas a pH 1 com HCl e extraídas com acetato de etila (200 mL;3x). A fração orgânica combinada foi concentrada sob vácuo fornecendo 1,117 g (3,73% de rendimento) de um resíduo denominado fração ácida (FA).

2. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

2.1 Atividade Antiinflamatória

2.1.1 Edema de pata induzido por carragenina

Neste experimento foram utilizados cinco ratos machos Wistar (100-150g, em jejum de 12h) ou seis camundongos machos Swiss (25 - 30g, em jejum de 12h) por grupo. Um grupo foi tratado por via oral, com os extratos brutos, outro com solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) e o terceiro com indometacina (10 mg/kg), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos, os animais foram submetidos a uma injeção sub-plantar de 0,1 mL de carragenina 1% em solução fisiológica na pata traseira esquerda. O volume da pata do rato foi medido imediatamente antes e após a injeção do agente edematogênico e em intervalos pré-estabelecidos, utilizando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália) submergindo as patas esquerdas posteriores dos animais, até o maléolo lateral, em um recipiente contendo uma solução salina 0,9%, conectado por um sistema de vasos comunicantes a um outro menor, contendo um transdutor de volume ligado a um multímetro digital. As variações de volume, mediante a imersão das patas no recipiente maior, foram numericamente registradas no multímetro digital nos tempos zero (imediatamente após as injeções de carragenina) 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após a injeção do agente flogístico (Winter e col., 1962).

As respostas edematogênicas foram expressas como aumento de volume da pata (mL), calculado por subtração do volume basal. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média,

para cada grupo de tratamento ou expressos como porcentagem de variação (aumento ou inibição) do volume total de edema em comparação com o grupo controle.

2.1.2 Edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados

Ratos *Wistar* machos (130-180g) foram anestesiados com éter e adrenalectomizados bilateralmente através de incisão lateral no abdômen. Animais controle (falso operados) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, sem no entanto serem removidas as adrenais. Após as cirurgias, os animais adrenalectomizados (ADX) receberam *ad libitum* NaCl (0,9%) a fim de serem evitados os efeitos da ausência dos mineralocorticóides, e os falso operados (FO), água mineral. Decorrida uma semana do procedimento cirúrgico, os animais ADX e FO foram submetidos ao teste de edema de pata por carragenina descrito anteriormente (Romay e col., 1998).

2.1.3 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Neste experimento foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25-35 g, separados em grupos de oito animais, os quais foram tratados por via oral com os extratos brutos, solução salina (NaCl 0,9%, 10 mL/kg) e dexametasona (1 mg/kg), utilizada como controle positivo. Após 60 minutos dos tratamentos, foram aplicados 20 µL de uma solução de óleo de cróton a 5 % em acetona P.A. na superfície interna da orelha direita. Na orelha esquerda foi aplicado volume equivalente do solvente. Após 4 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e porções padronizadas (6mm diâmetro) das duas orelhas foram retiradas. Cada uma delas foi pesada separadamente e a diferença de

peso foi considerada como o edema produzido pelo óleo de cróton (Tubaro et al, 1985 e Schintarelli,1982).

2.1.4 Modelo de peritonite induzida por carragenina

Para este teste foram utilizados grupos de camundongos tratados pela via oral com o extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF) ou dexametasona (1 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) como controles positivos do teste. Após 60 minutos dos tratamentos, os animais foram injetados pela via i.p. com carragenina (1%; 0,25mL). Após 4 horas, foram sacrificados por anestesia etérea profunda e 2 mL de PBS modificado (sem cálcio e magnésio) heparinizado (10 UI/mL) foram injetados na cavidade peritoneal. Em seguida, 60 movimentos de massagem foram realizados na parede abdominal e a seguir, o lavado peritoneal foi coletado para contagem, em câmara de Neubauer, do número de leucócitos totais migrados (Ferrándiz e Alcaraz, 1991). Os resultados foram expressos como média do número de leucócitos ($\times 10^5/\text{mL}$) de cada grupo experimental.

2.2 Atividade Antiproliferativa

A avaliação da atividade anticâncer do extrato bruto foi realizada em oito linhagens tumorais humanas, segundo a tabela 1. Desta forma, os extratos nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram adicionados em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), contendo uma linhagem por placa. Após um período de incubação de 48 horas, a 37°C, 5% CO₂ e 100% de umidade (Forma[®]), as células foram fixadas com 50 $\mu\text{L}/\text{compartimento}$ de ácido tricloroacético (TCA) 50%. Após 60 minutos a 4°C, o ácido tricloroacético foi removido e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após

secagem, serem coradas com 50 µL/compartimento de sulforrodamina B (SRB) a 0,4%. O excesso de SRB foi removido das placas após 30 minutos, através de quatro lavagens consecutivas com ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de 150 µL/compartimento de tampão trizma base (10µM). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada por leitor de elisa a 540 nm (Labsystems Multiskan MCC/340) (Skehan e col, 1990).

2.3 Atividade Antinociceptiva

2.3.1 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Grupos experimentais de 6 a 8 camundongos Swiss foram tratados com solução salina 0,9%, indometacina (10mg/kg), ou com os extratos brutos (EBHF, EBHQ e EBAE) de *P. reticulata* por via oral. Após uma hora, os animais receberam ácido acético (1,2% 0,1mL/10g i.p.). As contrações da parede abdominal seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 15 minutos de avaliação experimental (Koster e col.,1959; Vacher e col.,1964).

2.3.2 Teste de algesia induzida por calor

Foram utilizados grupos de 6 a 8 camundongos Swiss submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados pela via oral ou intraperitoneal com solução salina 0,9 %, morfina (20mg/kg i.p.) como controle positivo e com o extrato bruto (EBHF). Após 30, 60, 90 e 120 minutos desta administração, os animais foram submetidos ao estímulo algico em placa quente com temperatura controlada de $56,5 \pm$

0,1°C, até que apresentassem o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras), quando foi anotado o tempo de reação dos animais (Mazella et al,1991).

2.3.3 Teste da formalina

Foram utilizados grupos de até 8 camundongos tratados pela via oral com o extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF) na dose de 1000 mg/kg. Um grupo experimental, controle positivo do teste, foi tratado pela via oral (v.o.) com indometacina (10mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam injeção de 20µL de formalina 3% (formaldeído 1,2% em salina) na região intraplantar da pata posterior direita e foram colocados individualmente em contêntores localizados em frente a uma superfície refletora para facilitar a observação. Em seguida foi medida a reatividade dos animais, considerada como tempo gasto em segundos pelos animais lambendo ou mordendo a pata injetada (Hunnskaar e col, 1985). Os resultados foram expressos como médias dos tempos de reatividade dos animais em segundos, durante os 45 minutos de avaliação experimental.

2.3.4 Modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina

Para este teste foram utilizados grupos de até 8 camundongos tratados pela via oral com o extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF) na dose de 1000 mg/kg. Um grupo experimental, controle positivo do teste, foi tratado pela via oral (v.o.) com morfina (30mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, os animais receberam injeção de 50µL de capsaicina diluída em salina (32µg/mL) na região intraplantar da pata posterior direita e foram colocados individualmente em contêntores a semelhança do item anterior. Em seguida, o tempo gasto pelos animais lambendo ou mordendo a pata injetada foi medido

durante os 5 primeiros minutos após a injeção de capsaicina (Sakurada e col, 1992). Os resultados foram expressos como médias dos tempos de reatividade dos animais em segundos, durante os 5 minutos de avaliação experimental.

2.3.5 Avaliação da participação do sistema opioidérgico no efeito analgésico de *P. reticulata*

Influência do tratamento com naloxona sobre o efeito analgésico do EBHF

Grupos experimentais de até 8 camundongos Swiss foram previamente tratados por via subcutânea com salina ou com naloxona (5 mg/kg, s.c.), antagonista opióide não seletivo, 15 minutos antes dos tratamentos com o veículo (salina 10 ml/kg, s.c), com o EBHF (1000 mg/kg, p.o.) ou com morfina (20 mg/kg, p.o.), controle positivo do teste. Decorridos 30 min (s.c.) ou 60 min (p.o.) dos tratamentos, os animais receberam ácido acético (1,2% 0,1ml/10g i.p.) e as contrações da parede abdominal seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 15 minutos de avaliação experimental.

Influência do tratamento com naloxona quaternária (Methiodide) sobre o efeito analgésico do EBHF

Grupos experimentais de até 8 camundongos Swiss foram previamente tratados por via subcutânea com salina ou com naloxona quaternária (20 mg/kg, s.c.), antagonista opióide periférico, 15 minutos antes dos tratamentos com o veículo (salina 10 mL/kg, s.c), com o EBHF (1000 mg/kg, p.o.) ou com loperamida (20 mg/kg, p.o.), controle positivo do teste. Decorridos 30 min (s.c.) ou 60 min (p.o.) dos

tratamentos, os animais receberam ácido acético (1,2% 0,1mL/10g i.p.) e as contrações da parede abdominal seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 15 minutos de avaliação experimental a semelhança do item anterior.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico $p < 0,05$ para que fosse considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de *Duncan*, considerando-se o mesmo nível crítico.

Resultados

1. PROCESSAMENTO FITOQUÍMICO

1.1 Obtenção dos Extratos Brutos de *Plathymenia reticulata*

O processo de obtenção dos extratos brutos (EBHF, EBHQ e EBAE) de *Plathymenia reticulata* estão representados nas figuras 3 e 4.

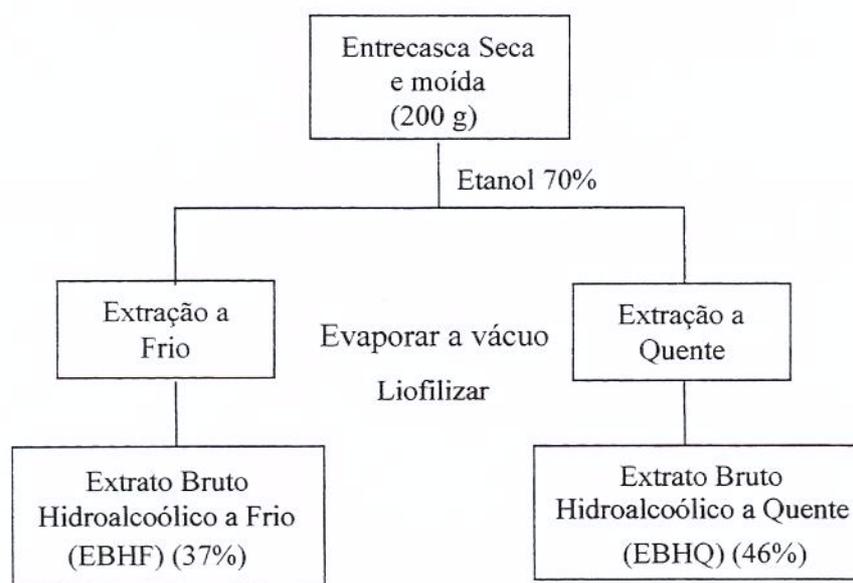


Figura 3: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos (EBHF e EBHQ) a partir da entrecasca seca e moída de *Plathymenia reticulata*.

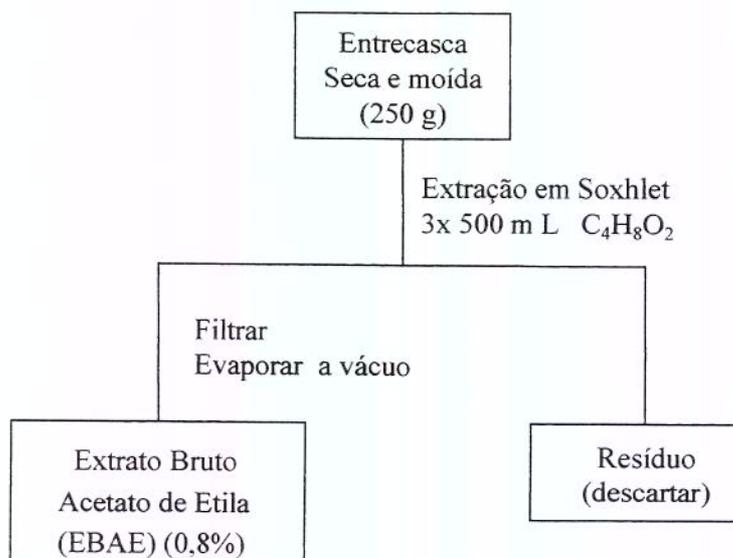


Figura 4: Fluxograma de obtenção do extrato bruto acetato de etila (EBAE) a partir da entrecasca seca e moída de *Plathymenia reticulata*.

1.2 Cromatografia em camada delgada

Os extratos brutos EBHF, EBHQ e EBAE obtidos da entrecasca de *P. reticulata* foram analisados por cromatografia em camada delgada. Foram testados vários sistemas de solventes para separação dos compostos presentes nos extratos, sendo o que produziu melhor separação foi a mistura butanol (50%): ácido acético (10%): água (40%), revelando a presença de substâncias polares nos extratos brutos hidroalcoólicos. As manchas foram visualizadas utilizando o reagente anisaldeído ou PEG (polietilenoglicol). Este último revelou a presença de mancha fluorescente (região pontilhada) quando exposto a luz ultravioleta (366 nm), indicando a presença de compostos aromáticos de média polaridade no extrato bruto acetato de etila. Os resultados estão demonstrados na Figura 5.

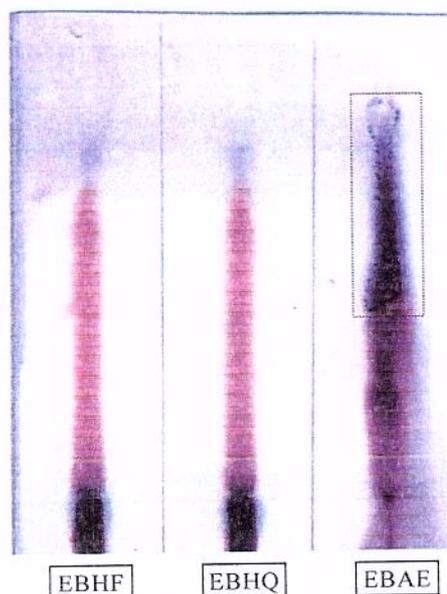


Figura 5: Cromatografia de camada delgada dos extratos EBHF, EBHQ e EBAE obtidos da entrecasca seca e moída de *P.reticulata*, utilizando como solvente uma mistura de butanol (50%): ácido acético (10%): água (40%) e como revelador o anisaldeído.

1.3 Triagem fitoquímica

Esteróides e Triterpenos: Negativo

A reação de Liebermann-Burchard da amostra não apresentou anel verde com interface marrom, indicativo da presença de esteróides e triterpenos.

Teste para Saponinas Esteroidais ou Triterpênicas: Positivo.

Houve formação de pequeno “halo” de espuma, que se sustentou por 20 minutos.

Comparação com padrão de solasodina, saponina esteroidal básica.

Teste para Cumarinas: Negativo

Não houve fluorescência à luz UV, em 366 nm.

Comparação com padrão de cumarina.

Teste para Flavonóides: Positivo

Houve alteração na coloração da amostra, após a adição de limalhas de magnésio e HCl 10%.

Comparação com padrão de Rutina.

Teste para Antracenosídeos: Negativo

Não houve aparecimento de coloração vermelha.

Teste para Antocianinas: Positivo

A coloração avermelhada da amostra se modificou para verde-castanho ou azul após alcalinização.

Teste para Taninos: Positivo

Houve mudança na coloração para esverdeada, após adição de gotas de solução de cloreto férrico.

Comparação com padrão de Ácido tânico.

Testes para Alcalóides: Negativo

Após reações com reagente de Mayer e com Ácido silicotúngstico, não houve precipitação.

1.4 Obtenção das frações de *Plathymenia reticulata*

Os processos de obtenção das frações (FB, FN e FA) de *Plathymenia reticulata* estão representados na figura 6.

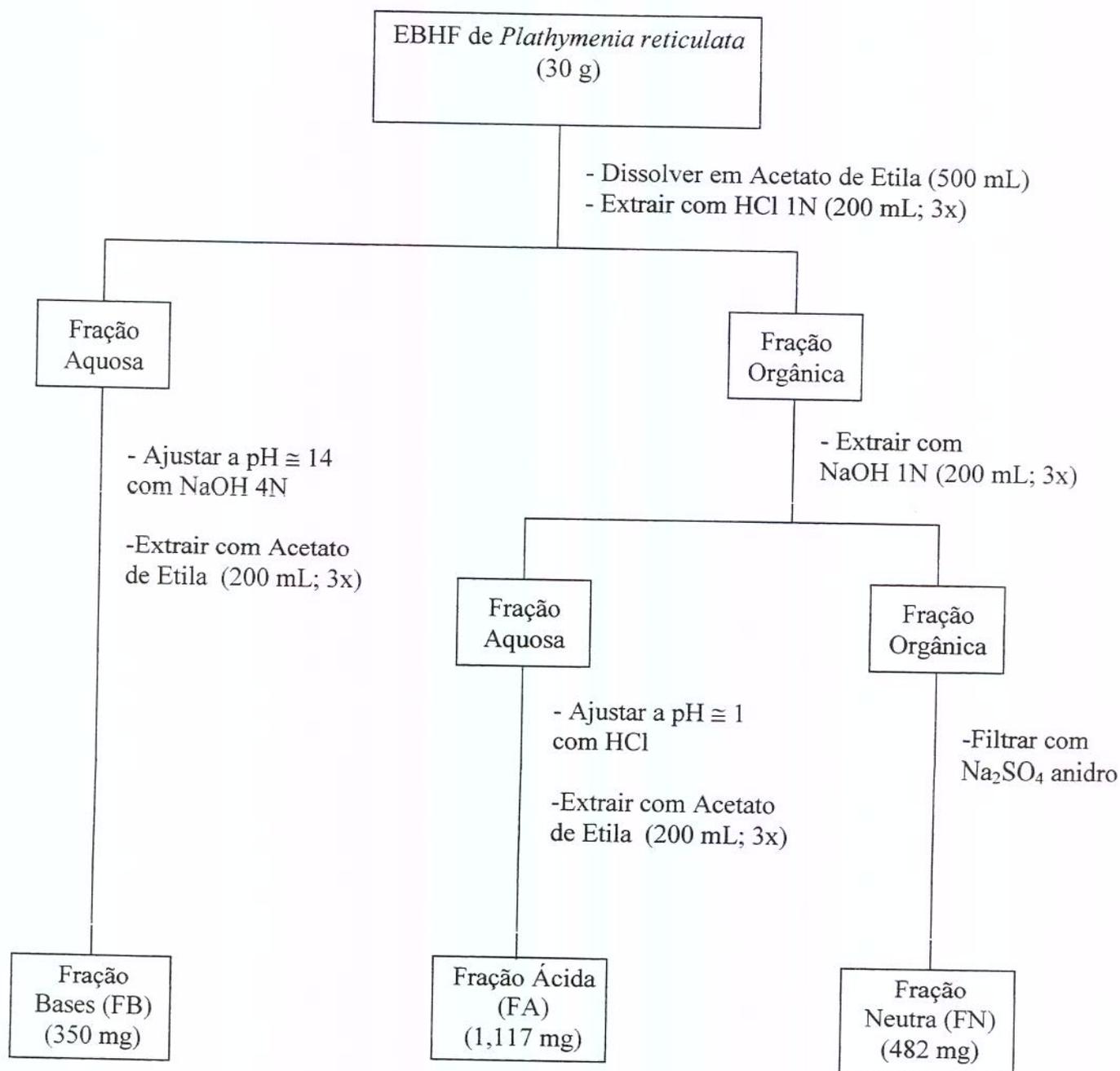


Figura 6: Fluxograma de obtenção das frações (FB, FA e FN) a partir do EBHF

de *Plathymenia reticulata*.

2. TESTES DE ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

2.1 Atividade Antiinflamatória

2.1.1 Edema de pata induzido por carragenina

Efeito dos extratos brutos hidroalcoólicos

Neste ensaio foram avaliados os efeitos dos extratos brutos hidroalcoólicos de *P. reticulata* sobre o decurso temporal da resposta inflamatória. O EBHQ (1000mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 38%, 42% e 43% após 2h, 4h e 5h da injeção subplantar de carragenina, respectivamente. O EBHF (1000mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 49%, 40%, 57% e 53% a partir de 2 h da administração do agente flogístico. A indometacina (10mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, apresentou um pico de inibição do edema a partir da segunda hora da injeção do agente flogístico (32%, 45%, 44% e 47%). Os resultados estão demonstrados no gráfico 1.

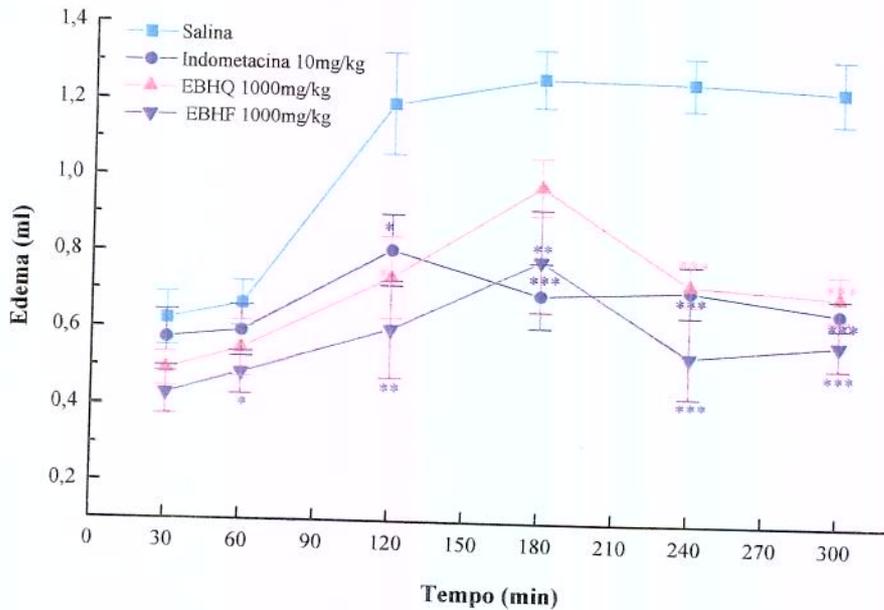


Gráfico 1: Efeito da administração oral de indometacina e dos extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) de *Plathymenia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 5 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(3,16)}$: 30 min = 6,43 $p > 0,01$; 1h = 3,99 $p > 0,05$; 2h = 4,71 $p < 0,05$; 3h = 8,97 $p < 0,001$; 4h = 16,7 $p < 0,001$; 5h = 22,78 $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Essa resposta antiedematogênica mostrou-se dose dependente e o valor da DE_{50} calculado por regressão linear foi de 1,2g/kg. Os resultados estão demonstrados no gráfico 2.

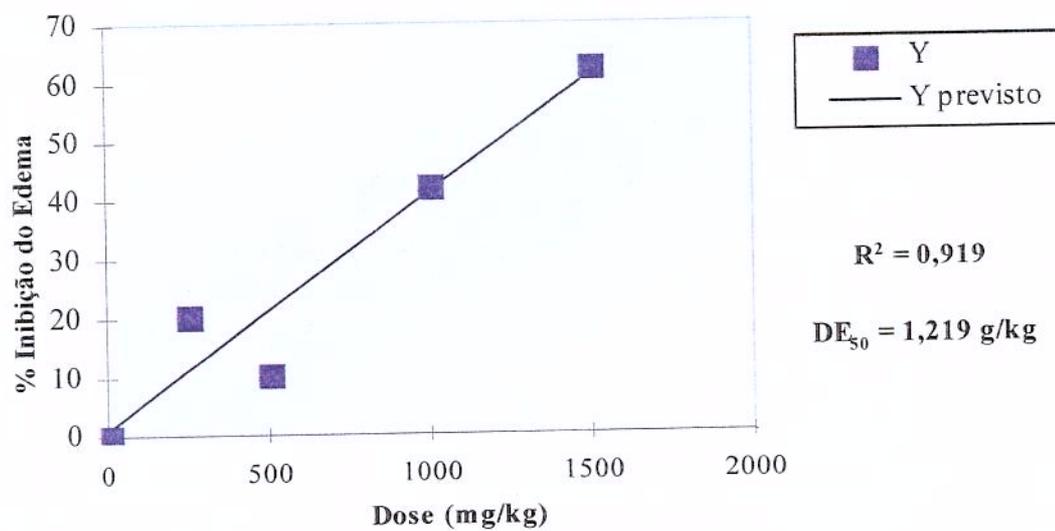


Gráfico 2: Curva dose – efeito do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) de *Plathymenia reticulata* no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Efeito do extrato bruto acetato de etila

Nos animais controles tratados com salina (10 mL/kg, p.o.), a injeção subplantar de carragenina induziu a formação de um edema progressivo que atingiu o pico máximo após 3 horas da aplicação do agente flogístico. O tratamento prévio com o EBHF (1000mg/kg, p.o.) reduziu o edema em 35%, 30%, 30% e 29% após 2, 3, 4 e 5 hs da injeção subplantar de carragenina. A administração prévia do EBAE (1000mg/kg, p.o.) não alterou o edema de pata induzido pela carragenina. A indometacina (10mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, apresentou um pico de inibição do edema a partir da segunda hora da injeção do agente flogístico (35%, 29%, 48% e 44%). Os resultados estão demonstrados no gráfico 3.

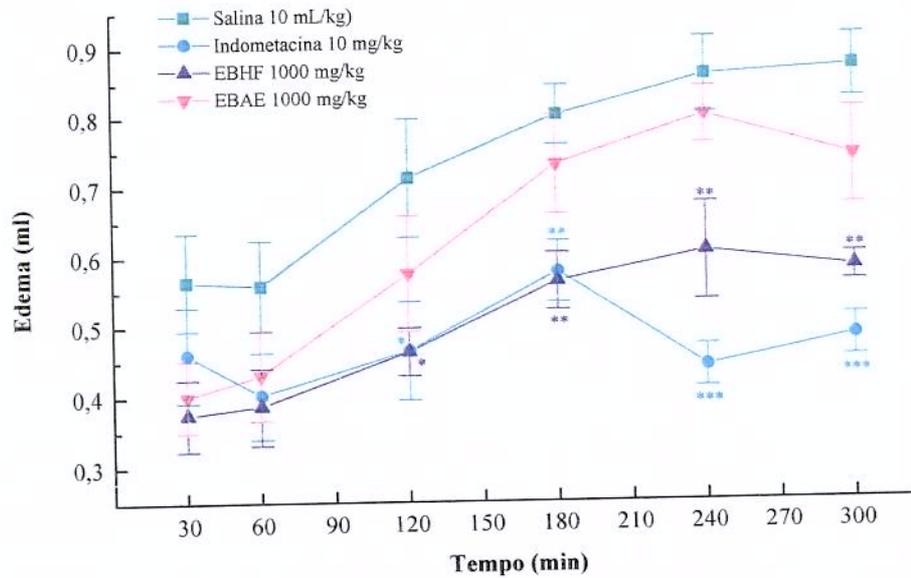


Gráfico 3: Efeito da administração oral de indometacina, do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) e do extrato bruto acetato de etila (EBAE) obtidos de *Plathymenia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 5 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(3,16)}$: 30 min = 1,98 $p > 0,05$; 1h = 1,62 $p > 0,05$; 2h = 2,76 $p > 0,05$; 3h = 5,23 $p < 0,05$; 4h = 15,12 $p < 0,001$; 5h = 12,97 $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados

Nos animais falso operados (FO) ou adrenalectomizados (ADX) tratados com salina (10 mL/kg, v.o.), a injeção subplantar de carragenina induziu a formação de um edema progressivo que atingiu o pico máximo após 4 horas da aplicação do agente flogístico. O tratamento prévio com o EBHF (1000mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 42% e 45% após 4 e 5 horas da injeção subplantar de carragenina. A dexametasona (2 mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 50%, 57% e 60% após a terceira hora de avaliação experimental. A indometacina (10mg/kg, v.o.) apresentou um pico de inibição do edema (43 e 48%) a partir da quarta hora da injeção do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no gráfico 4.

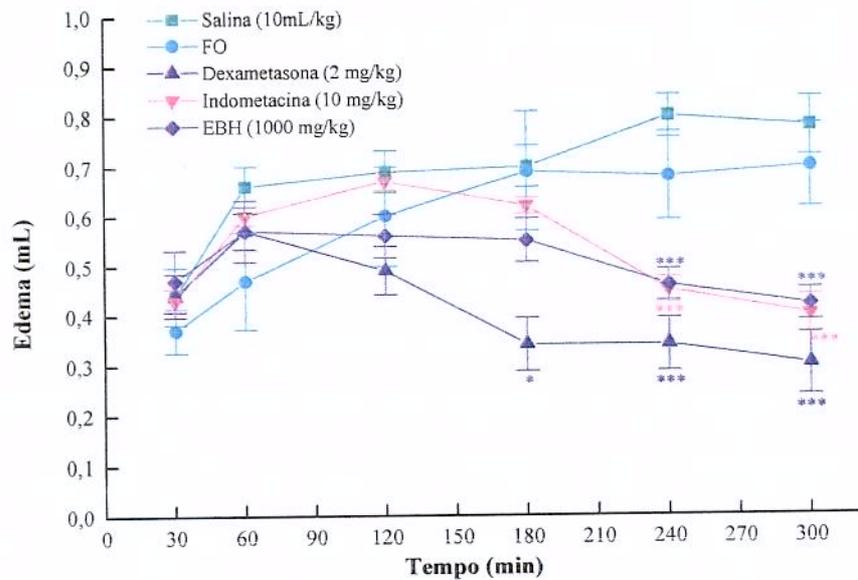


Gráfico 4: Efeito da administração oral de indometacina, dexametasona e do extrato bruto hidroalcoólico (EBHF) obtidos de *Plathymeria reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos adrenalectomizados. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 5 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(4,20)}$: 30min: 0,62 $p > 0,05$; 1h: 1,45 $p > 0,05$; 2h: 1,69 $p > 0,05$; 3h: 4,10 $p < 0,05$; 4h: 11,49 $p < 0,001$; 5h: 11,74 $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

Efeito das frações (FB, FN e FA) obtidas a partir do EBHF de *P. reticulata*

O tratamento prévio com o EBHF (1000mg/kg, v.o.) reduziu o edema de pata em 32%, 53% e 64% após 3, 4 e 5hs da injeção subplantar de carragenina. A fração básica (FB; 500 mg/kg v.o.) foi capaz de reduzir o edema de pata em 34% e 26% a partir de 4h e a fração neutra (FN; 500mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 37% e 45% após 4h e 5h da injeção do agente flogístico, respectivamente. A administração prévia da fração ácida (FA; 500 mg/kg v.o.) não alterou o edema de pata induzido pela carragenina. A indometacina (10mg/kg, v.o.), controle positivo do teste, apresentou um pico de inibição do edema a partir da terceira hora da injeção do agente flogístico (21%, 52% e 62%). Os resultados estão demonstrados no gráfico 5.

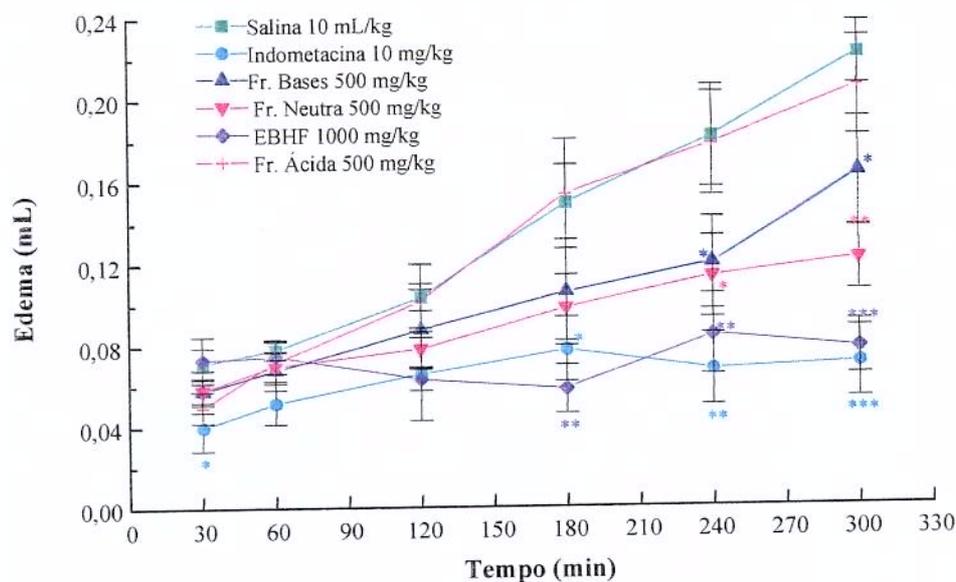


Gráfico 5: Efeito da administração oral de indometacina, do extrato bruto (EBHF) e das frações obtidas de *Plathymentia reticulata* no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de 6 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(5,27)}$: 30 min = 1,86 $p > 0,05$; 1h = 2,49 $p > 0,05$; 2h = 1,29 $p > 0,05$; 3h = 4,03 $p < 0,01$; 4h = 3,83 $p < 0,01$; 5h = 10,9 $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.1.2 Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton

Os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ 1000mg/kg; EBHF 250, 500 e 1000mg/kg,) de *P. reticulata*, administrados por via oral não foram capazes de reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton. A dexametasona, usada como controle positivo na dose de 1 mg/kg e administrada pela mesma via, reduziu o edema em 85% após 4 horas da administração do agente flogístico. Os resultados estão demonstrados no gráfico 6.

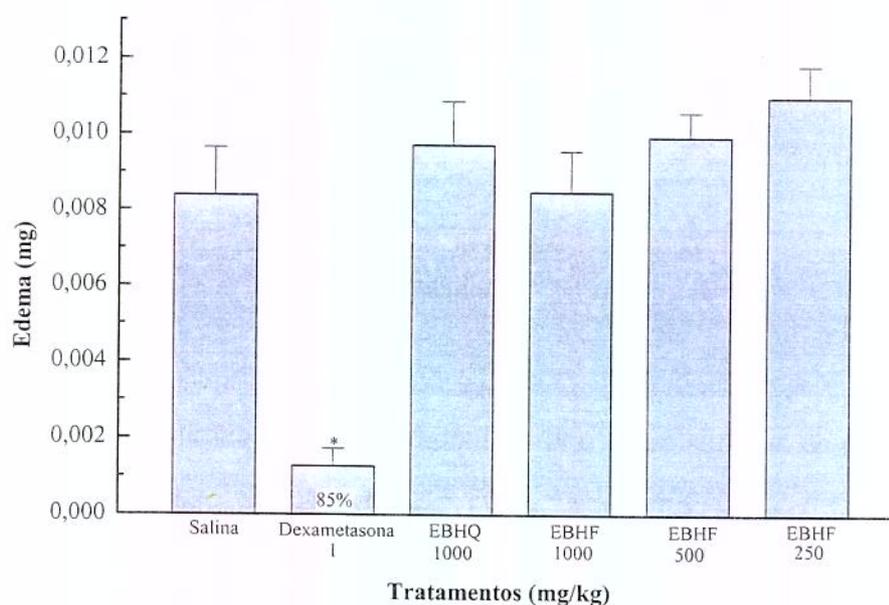


Gráfico 6: Efeito da administração oral de dexametasona e dos extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) de *Plathymania reticulata* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 7 a 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F(5,39) = 14,93$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$).

2.1.3 Modelo de peritonite induzida por carragenina

A injeção intraperitoneal de carragenina (2,5 mg) nos animais previamente tratados com a solução salina (10 mL/kg, v.o.) induziu a migração de $30,4 \pm 3,4 \times 10^5$ leucócitos/mL. O tratamento prévio com o EBHF (1000 mg/kg, v.o.) reduziu a migração leucocitária para a cavidade peritoneal em 60% ($16,12 \pm 2,6 \times 10^5$ leucócitos/mL). A dexametasona (1 mg/kg, v.o.) e a indometacina (10 mg/kg, v.o.), utilizadas como controle positivo, reduziram a migração leucocitária em 75% ($10,12 \pm 1,9 \times 10^5$ leucócitos/mL) e 67% ($13,24 \pm 1,8 \times 10^5$ leucócitos/mL), respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico 7.

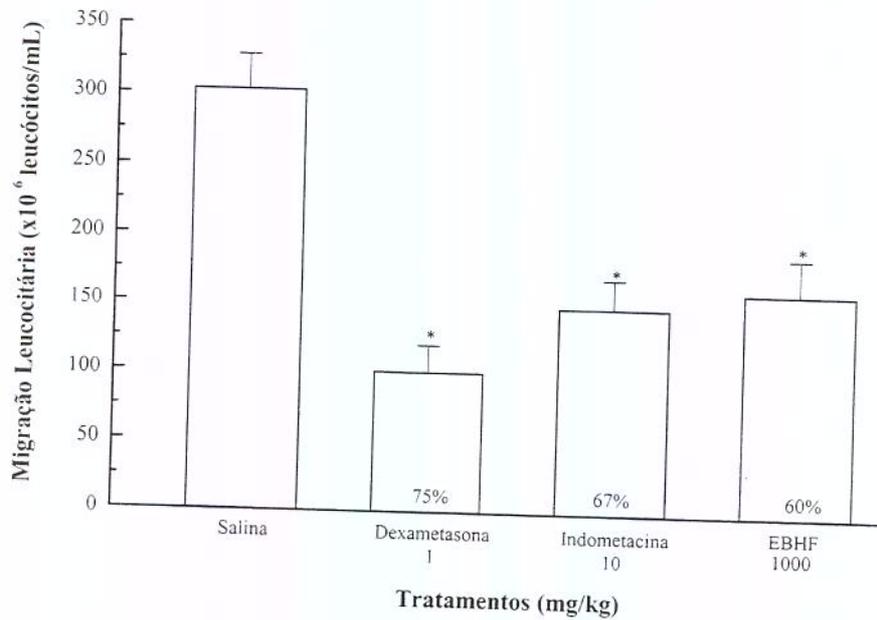


Gráfico 7: Migração leucocitária induzida pela carragenina (2,5 mg) injetada na cavidade intraperitoneal de camundongos previamente tratados pela via oral com salina (10 mL/kg), dexametasona, indometacina e com o extrato bruto hidroalcoólico de *P. reticulata* (EBHF). Os resultados são expressos como média ± erro padrão de 6 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(4,25)} = 25,45$, $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$).

2.2 Atividade Antiproliferativa

2.2.1. Curva concentração-resposta da indometacina

O gráfico 8 representa a curva concentração-resposta da indometacina sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração utilizada. A curva demonstrou que a indometacina possui atividade antiproliferativa com efeito citostático sobre todas as linhagens e citocida principalmente para células de rim (786-0), melanoma (UACC-62) e próstata (PCO-3). A atividade citostática é considerada para efeito inibitório acima de 50% (50 a 0) e citocida quando para valores negativos.

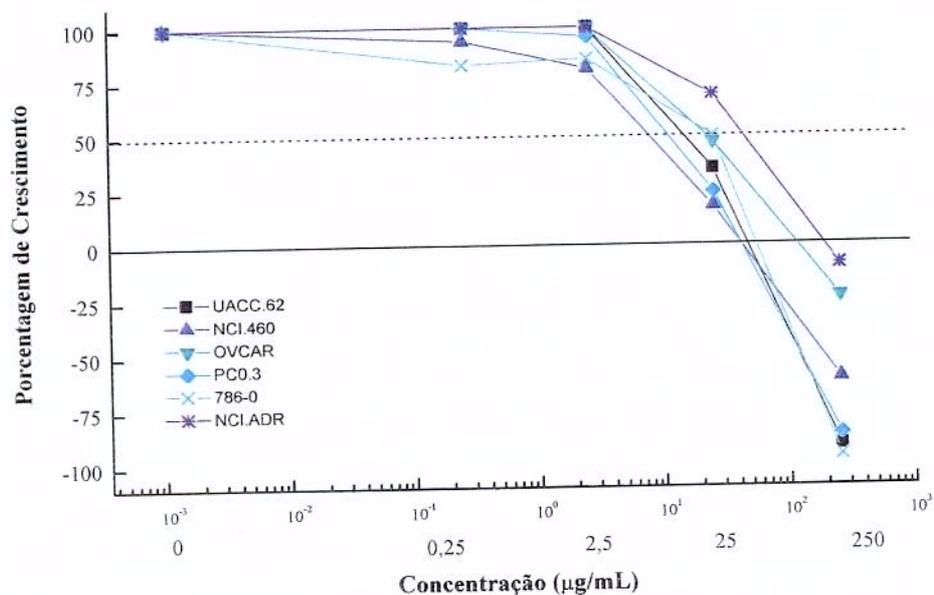


Gráfico 8: Curva concentração-atividade da indometacina sobre as linhagens celulares tumorais humanas .

2.2.3. Curva concentração-resposta da fração básica (FB) obtida do fracionamento do EBHF

O gráfico 10 representa a curva concentração-resposta da fração FB sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que FB possui efeito citostático sobre todas as linhagens e citocida para as células de melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR-03) e pulmão (NCI-460).

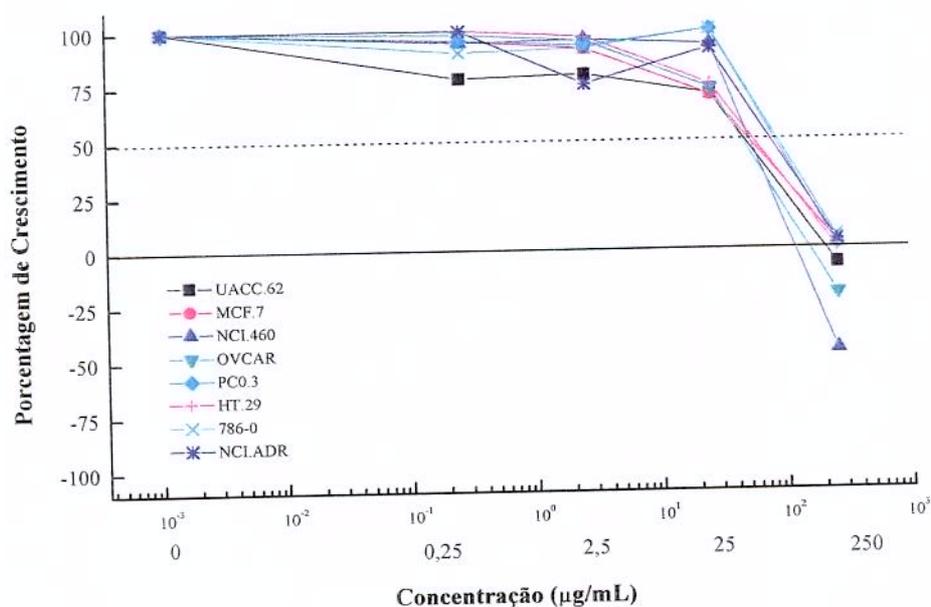


Gráfico 10: Curva concentração-atividade da fração básica (FB) de *Plathymenia reticulata* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

2.2.4. Curva concentração-resposta da fração neutra (FN) obtida do fracionamento do EBHF

O gráfico 11 representa a curva concentração-resposta da fração FN sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. A curva demonstrou que FN apresentou seletividade, efeito citostático sobre todas as linhagens e citocida para as células de melanoma (UACC-62), ovário (OVCAR-03) e pulmão (NCI-460).

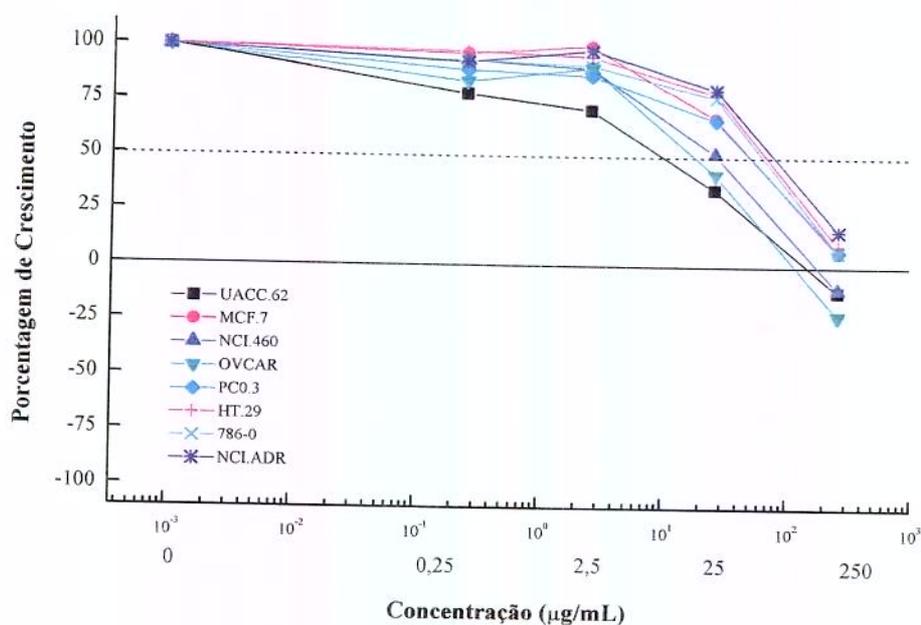


Gráfico 11: Curva concentração-atividade da fração neutra (FN) de *Plathymentia reticulata* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

2.2.5. Curva concentração-resposta da fração ácida (FA) obtida do fracionamento do EBHF

O gráfico 12 representa a curva concentração-resposta da fração FE/F sobre as linhagens celulares, relacionando a porcentagem de crescimento da célula e a concentração de extrato utilizado. O efeito antiproliferativo (citostático) foi observado apenas para as linhagens de melanoma (UACC-62) e ovário (OVCAR-03).

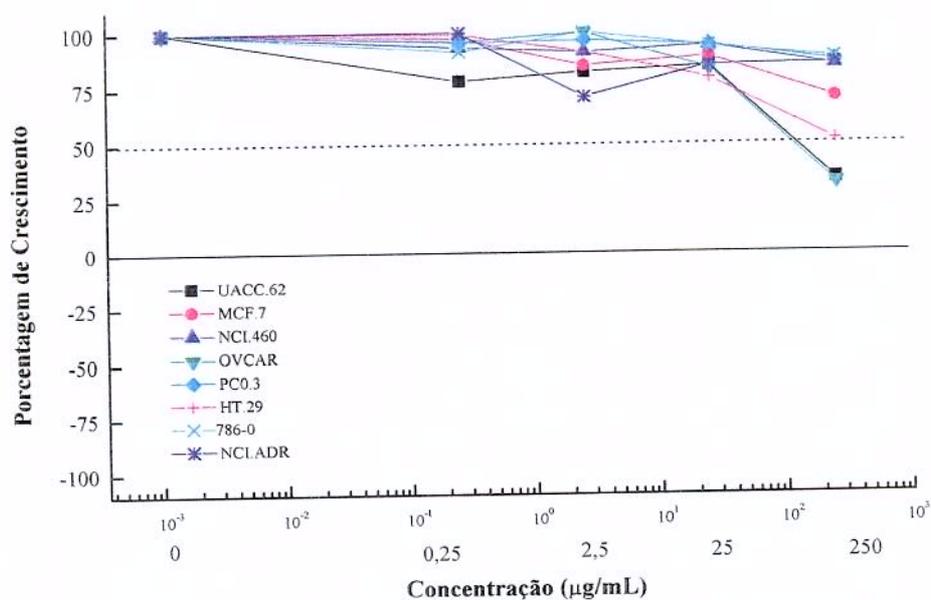


Gráfico 12 : Curva concentração-atividade da fração ácida (FA) de *Plathymenia reticulata* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

2.2.5. Curva concentração-resposta do extrato bruto acetato de etila (EBAE) obtido da entrecasca de *Plathymenia reticulata*

A análise desta curva demonstrou que o extrato apresenta seletividade para a linhagem de mama (MCF-7) com efeito citostático já na menor concentração e citocida na mais elevada. Para a linhagem de cólon (HT 29) o EBAE produziu inibição de crescimento na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e morte celular com 250 $\mu\text{g/mL}$. Para as demais linhagens, o EBAE apresentou efeito citostático ou citocida somente na concentração mais elevada (250 $\mu\text{g/mL}$) (Gráfico 13).

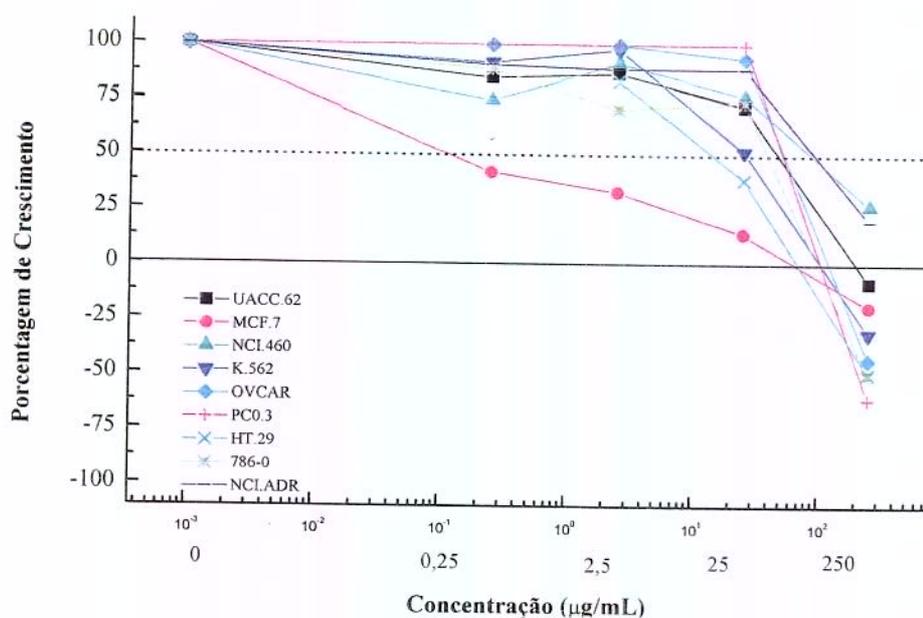


Gráfico 13: Curva concentração-atividade do extrato bruto acetato de etila (EBAE) de *Plathymenia reticulata* sobre as linhagens celulares tumorais humanas.

2.3 Atividade Antinociceptiva

2.3.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético

Efeito dos extratos brutos hidroalcoólicos

No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10mL/kg, v.o), a injeção de ácido acético (1,2% em salina 0,9%, i.p.) induziu $41,3 \pm 2,5$ contorções durante os 30 minutos de avaliação experimental. O pré tratamento com os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ 1000mg/kg; EBHF 1000, 500 e 250mg/kg v.o) de *P. reticulata* reduziram o número de contorções abdominais em 61% ($16,2 \pm 2,4$), 54% ($19 \pm 5,3$), 35% ($26,8 \pm 8,9$) e 12% ($36,5 \pm 1,5$) respectivamente. A indometacina, controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 62% ($15,8 \pm 2,0$) Os resultados estão representados no gráfico 14.

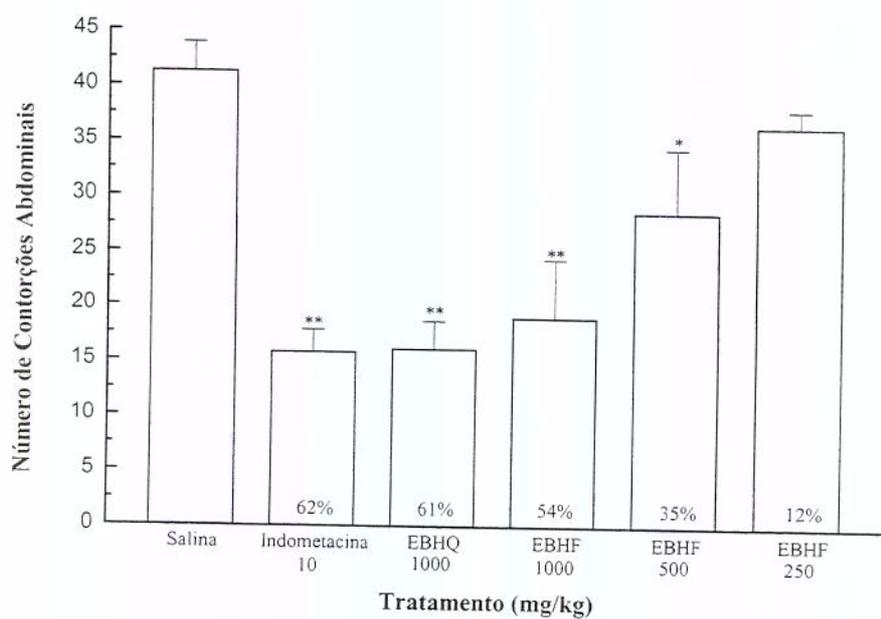


Gráfico 14: Contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min) pela via oral com salina (10ml/kg), indometacina e com os extratos brutos hidroalcoólicos de *P. reticulata* (EBHQ e EBHF). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 6 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(5,30)} = 8,97$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Efeito do extrato bruto acetato de etila

No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10mL/kg, p.o.), a injeção de ácido acético (1,2% em salina 0,9%, i.p.) induziu $39,8 \pm 3,6$ contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com os extratos brutos (EBHF e EBAE 1000mg/kg; p.o.) de *P. reticulata* demonstrou que somente o EBHF reduziu o número de contorções abdominais em 53% ($18,4 \pm 3,4$). A indometacina, controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 45% ($21,7 \pm 3,6$) Os resultados estão representados no gráfico 15.

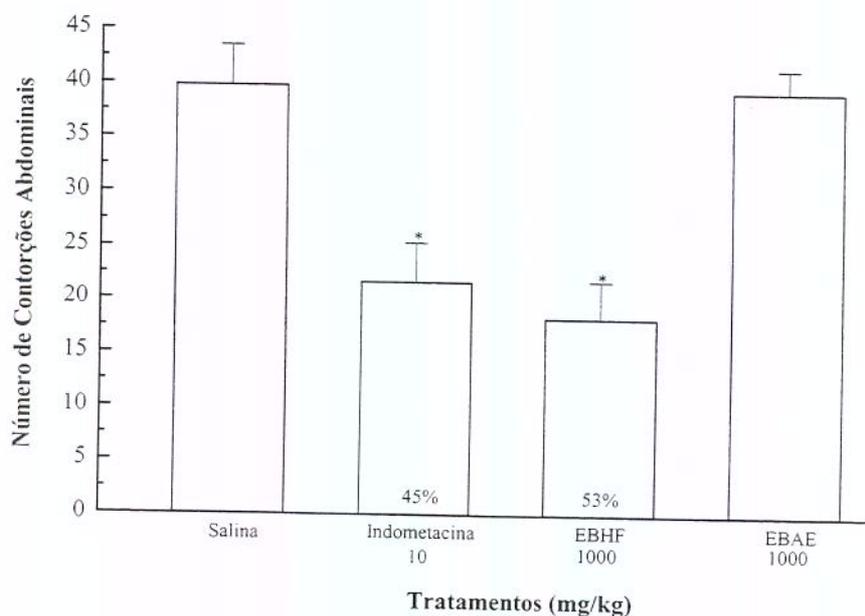


Gráfico 15: Contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min) pela via oral com salina (10mL/kg), indometacina (10 mg/kg), extrato bruto hidroalcoólico a frio (EBHF 1000 mg/kg) e extrato bruto acetato de etila (EBAE 1000 mg/kg) de *P. reticulata*. Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F(3,28)= 12,2$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$).

2.3.2 Teste de Algesia Induzida por Calor (Placa Quente)

A atividade antinociceptiva foi avaliada também utilizando-se a morfina como controle positivo do teste. O EBHF de *P. reticulata* nas doses de 500, 200 e 100 mg/kg (i.p.) foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo algico térmico ($56,5 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$) em 63% (500 e 200mg/kg após 60 minutos) e 83% (500mg/kg após 90 minutos). A morfina (20mg/kg i.p.) aumentou o tempo de reação dos animais em 108% e 60% após 30 e 60 minutos dos tratamentos, respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico 16.

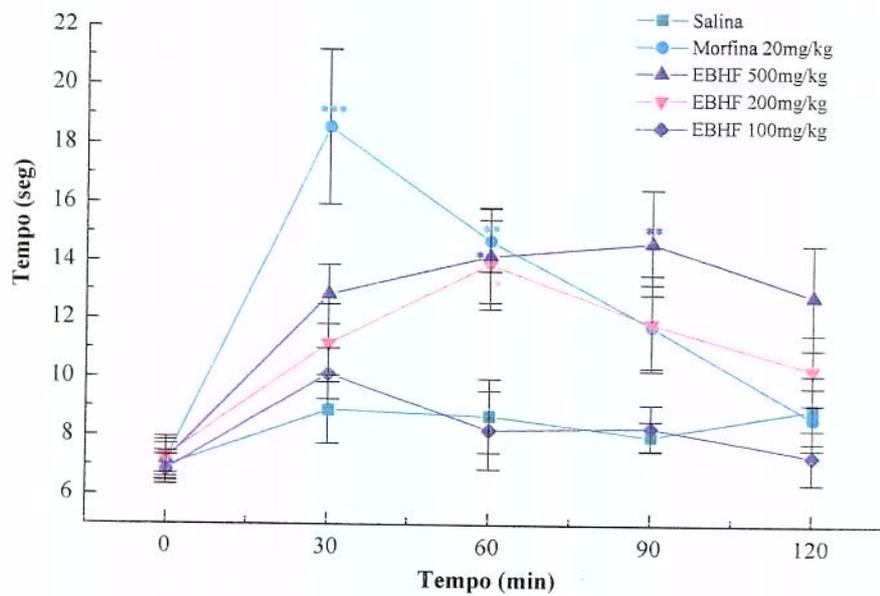
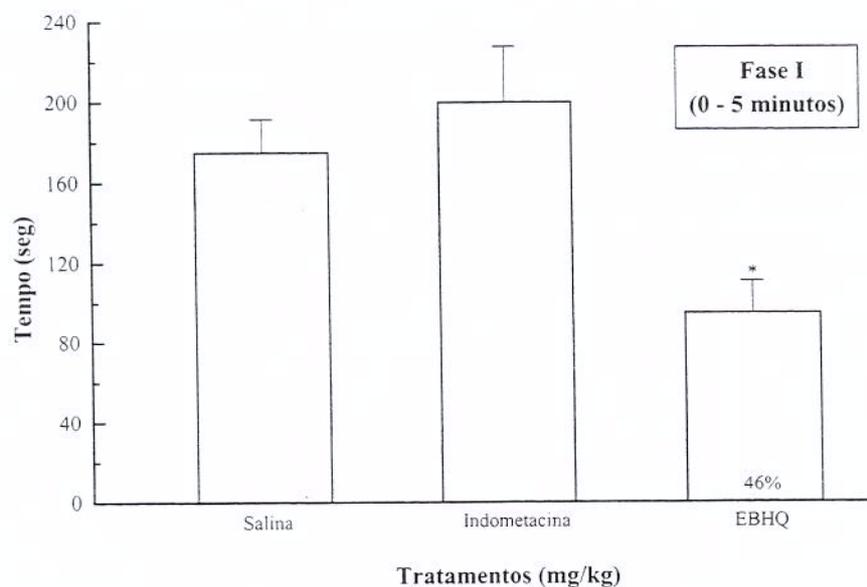


Gráfico 16: Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (30 min) pela via intraperitoneal com salina (10ml/kg), morfina e com o extrato bruto hidroalcoólico de *P. reticulata* (EBHF). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: Basal: $F_{(4,35)} = 0,99$ $p > 0,05$; 30min: $F_{(4,35)} = 5,95$ $p < 0,001$; 60min: $F_{(4,35)} = 5,28$ $p < 0,01$; 90min: $F_{(4,35)} = 4,36$ $p < 0,01$; 120min: $F_{(4,35)} = 2,62$ $p > 0,05$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

2.3.3 Teste da Formalina

A injeção intraplantar de formalina (3% em salina, 20 μ L) na pata posterior de camundongos produziu intensa resposta nociceptiva em duas fases distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (dor neurogênica) e a segunda de 25 a 45 minutos (dor inflamatória). Nos animais previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), a reatividade na primeira fase de nocicepção foi de 175 ± 16 segundos e na segunda fase foi de 103 ± 27 segundos ($n = 8$). A indometacina (10 mg/kg), controle positivo do teste, reduziu somente a segunda fase de nocicepção em 76% ($23 \pm 4,1$ s; $n = 7$). O pré-tratamento com o EBHF (1000 mg/kg) reduziu a primeira e segunda fase da nocicepção em 46% ($94,8 \pm 15$ s; $n = 8$) e 55% ($46,8 \pm 7,4$ s; $n = 8$), respectivamente. Os resultados estão demonstrados no gráfico 17.



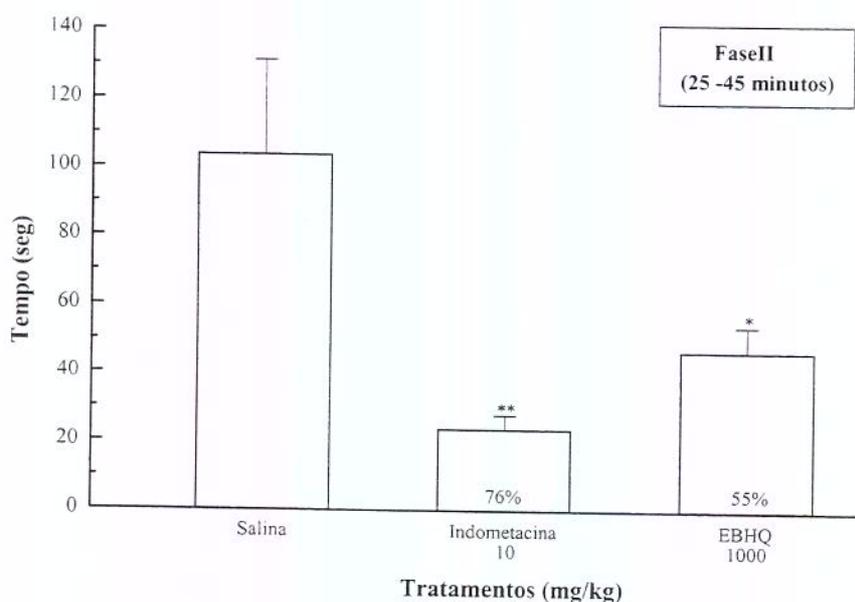


Gráfico 17: Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10ml/kg), indometacina e com o extrato bruto hidroalcoólico de *P. reticulata* (EBHQ). As colunas indicam as médias da fase I (0 a 5 minutos – dor neurogênica) e fase II (25 a 45 minutos – dor inflamatória) \pm erro padrão de 7 a 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,20)} = 7,73$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

2.3.4 Modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina

A injeção intraplantar de capsaicina (32 μ g/mL em salina) na pata posterior de camundongos induz um processo nociceptivo de curta duração (5 minutos). Nos animais previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), a reatividade foi de $98,37 \pm 6,5$ segundos (n = 8). A morfina (30 mg/kg), controle positivo do teste, reduziu a resposta álgica dos animais em 69% ($30,17 \pm 6,5$ s; n = 6). O pré-tratamento com o EBHF (1000 mg/kg) reduziu a nocicepção em 72% ($27,34 \pm 4$ s; n = 6) Os resultados estão demonstrados no gráfico 18.

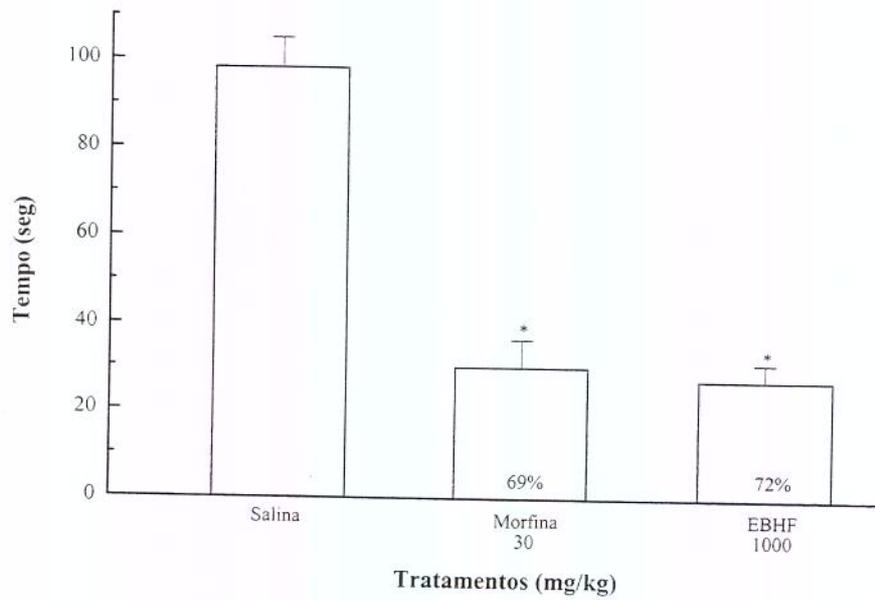


Gráfico 18: Reatividade à aplicação intraplantar de capsaicina ($1,6\mu\text{g/pata}$) na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10mL/kg), morfina (30 mg/kg) e com o extrato bruto hidroalcoólico de *P. reticulata* (EBHF : 1000 mg/kg). As colunas indicam as médias \pm erro padrão de 6 a 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,17)} = 47,68$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$).

2.3.5 Avaliação da Participação do Sistema Opioidérgico no Efeito Analgésico de *P. reticulata*

Influência da morfina e do EBHF no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

No grupo controle, a injeção de ácido acético (1,2% em salina 0,9%, i.p.) induziu $43,1 \pm 7,7$ contorções abdominais durante os 15 minutos de avaliação experimental. O tratamento com o EBHF (1000mg/kg; p.o.) de *P. reticulata* ou com morfina (20 mg/kg, p.o.), controle positivo do teste, reduziu o número de contorções abdominais em 41% ($24,16 \pm 2,4$) e 96% ($2,5 \pm 1,6$) respectivamente. Os resultados estão representados no gráfico 19.

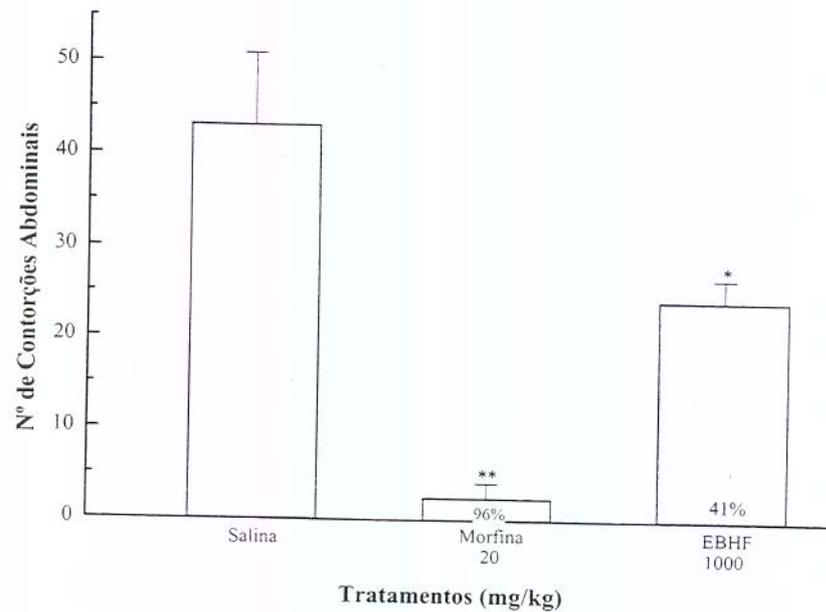


Gráfico 19: Influência do tratamento prévio (15 min) com salina (10mL/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva da morfina (20 mg/kg, p.o.) ou do EBHF (1000 mg/kg, p.o.) de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina). Os resultados são expressos em média ± erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,18)} = 19,37$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$ ** $p < 0,001$).

Influência do tratamento com naloxona sobre o efeito analgésico do EBHF

A administração prévia (15 min) do antagonista opióide naloxona (5 mg/kg, s.c.) reduziu o efeito antinociceptivo da morfina em 48% ($27,25 \pm 3,7$), não modificando entretanto, a atividade do EBHF ($34,6 \pm 3,7$; 35% de inibição). Os resultados estão representados no gráfico 20.

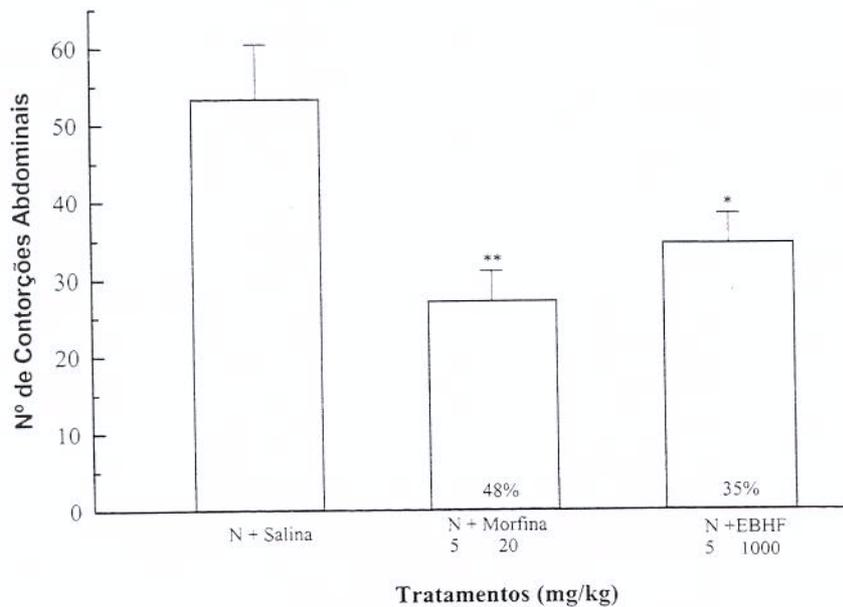


Gráfico 20: Influência do tratamento prévio (15 min) com naloxona (5 mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva da morfina (20 mg/kg, p.o.) ou do EBHF (1000 mg/kg, p.o.) de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina). Os resultados são expressos como média \pm erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,21)} = 6,94$ $p < 0,01$. Teste de Duncan: * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

Influência da loperamida e do EBHF no teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

Neste experimento, comparativamente ao grupo controle ($50,75 \pm 7,27$), os tratamentos com o EBHF (1000mg/kg; p.o.) ou com a loperamida (40 mg/kg, p.o.), 15 minutos após a injeção de solução salina (10mL/kg, s.c.) reduziram o número de contorções abdominais em 47% ($26,7 \pm 4,02$) e 97% ($1,25 \pm 0,82$), respectivamente (Gráfico 21).

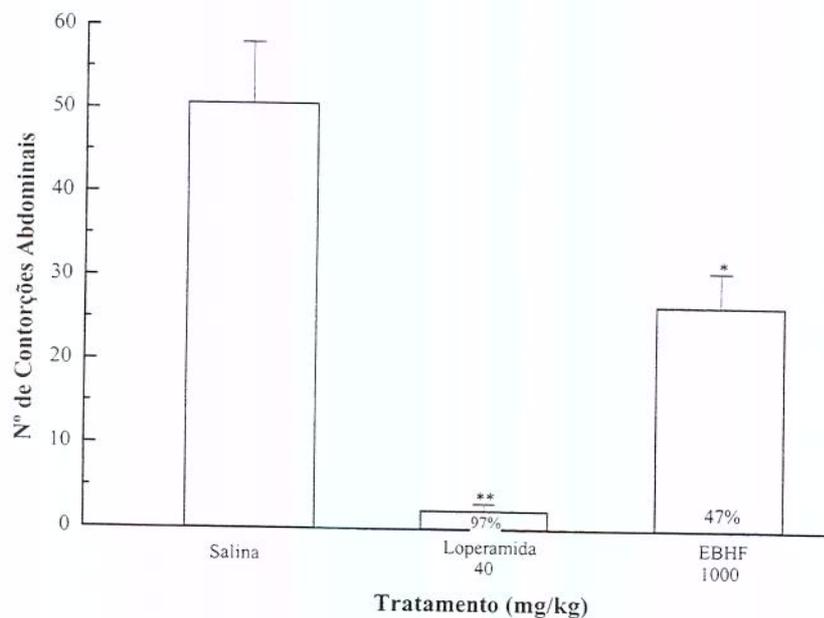


Gráfico 21: Influência do tratamento prévio (15 min) com salina (10mL/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva da loperamida (40 mg/kg, p.o.) ou do EBHF (1000 mg/kg, p.o.) de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina). Os resultados são expressos em média ± erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,21)} = 26,31$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: * $p < 0,01$ ** $p < 0,001$).

Influência do Tratamento com Naloxona Quaternária sobre o Efeito Analgésico do EBHF

A administração de naloxona quaternária, antagonista opióide periférico (20 mg/kg, s.c.), 15 minutos antes do tratamento com o EBHF (1000 mg/kg, p.o.) bloqueou o efeito antinociceptivo do extrato. A analgesia produzida pela loperamida foi mantida, reduzindo o número de contorções abdominais em 95% ($1,25 \pm 0,82$) em relação ao grupo controle ($29,28 \pm 5,6$). Os resultados estão representados no gráfico 22.

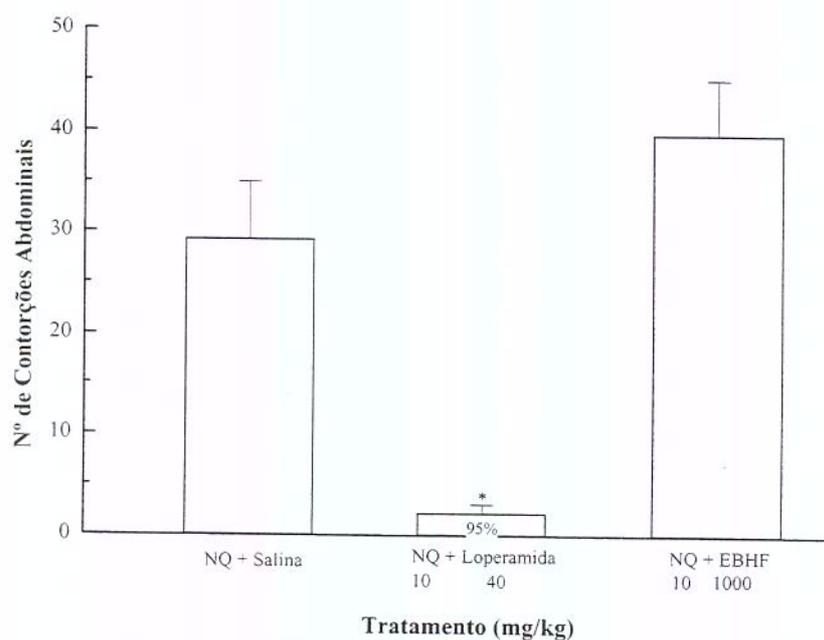


Gráfico 22: Influência do tratamento prévio (15 min) com naloxona quaternária (20mg/kg, s.c.) sobre a atividade antinociceptiva da loperamida (40 mg/kg, p.o.) ou do EBHF (1000 mg/kg, p.o.) de *P. reticulata* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina). Os resultados são expressos em média \pm erro padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA: $F_{(2,20)} = 20,76$ $p < 0,001$. Teste de Duncan: $*p < 0,001$).

Discussão

A *Plathymenia reticulata* Benth., conhecida popularmente como vinhático, é uma árvore de aproximadamente 15 metros de altura encontrada em regiões de cerrado brasileiro. A entrecasca do caule desta espécie é utilizada popularmente no tratamento de diversos processos inflamatórios. Por este motivo, o material vegetal foi coletado no município de Senador Canedo, interior de Goiás, para a obtenção de extratos brutos e frações para avaliação em modelos experimentais de inflamação, câncer e algesia.

As cascas secas e moídas de *P. reticulata* foram submetidas a extrações em etanol 70% a quente (EBHQ) e a frio (EBHF) para avaliação da estabilidade térmica dos princípios ativos. De acordo com os resultados obtidos, a atividade farmacológica do extrato bruto a quente (EBHQ) foi semelhante à do extrato bruto a frio (EBHF), oferecendo ainda um maior rendimento por extração.

O material vegetal foi também submetido a extração em Soxhlet para a obtenção do extrato bruto acetato de etila (EBAE), para avaliação da atividade de substâncias de média polaridade.

Os extratos brutos hidroalcoólicos de *P. reticulata* apresentam coloração avermelhada, podendo produzir resultados falso positivos em testes fitoquímicos, já que muitas substâncias são detectadas pela mudança de cor das reações. Nessas condições, os principais grupos detectados através da triagem fitoquímica, foram flavonóides, taninos, antocianinas e saponinas.

Os taninos são substâncias fenólicas e hidrossolúveis, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais, pois formam complexos insolúveis com alcalóides, gelatinas e outras proteínas. Esta complexação também é responsável por suas propriedades, como controle de crescimento de insetos, fungos e bactérias, bem como para seus usos industriais. Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragia, queimaduras, problemas estomacais, renais, urinários e processos inflamatórios em geral (Gaulejac e col, 1999; Simões e col, 1999).

Os flavonóides são substâncias amplamente distribuídas na natureza contribuindo para a coloração das flores, frutos e folhas. Existem muitos trabalhos que descrevem os efeitos farmacológicos dos flavonóides, entre eles: atividade antiinflamatória, imunomoduladora, antioxidante, diurética, antiespasmódica, antimicrobiana e anticancerígena (Middleton e col, 2000).

Outros compostos fenólicos como as antocianinas apresentam ação antioxidante, anticancerígena, antiinflamatória e contribuem na manutenção da permeabilidade vascular. Alguns estudos revelam que plantas ricas em antocianinas, como o mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) quando consumidas diariamente são capazes de retardar a degeneração neurológica e melhorar a visão global em pacientes com retinopatias (Gaulejac e col, 1999; Youdim e col, 2000).

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos com ação hipocolesteromiantes, antiinflamatória e, recentemente tem sido investigada atividade antiviral de saponinas isoladas de *Glycyrrhiza glabra* e da *Calendula arvensis* entre outras (Ferreira e col, 1997).

O processo de fracionamento do extrato bruto (EBHF) foi direcionado para a obtenção de frações que se diferenciavam pelo pH de acordo com as soluções extratoras. Deste modo, foram obtidas frações ricas em substâncias básicas (FB), ácidas (FA) e uma fração neutra (FN) (Hattori e col, 1978).

Apesar da utilização popular das cascas desta espécie vegetal no tratamento de diversos processos inflamatórios, nenhum estudo farmacológico relata a validação deste uso. Este fato orientou parte dos objetivos deste trabalho que foi investigar, em animais de laboratório, a atividade antiinflamatória dos extratos e frações de *P. reticulata*. Foi utilizada também uma metodologia *in vitro* para monitorar a atividade antiproliferativa em células tumorais humanas e, além disso, procuramos caracterizar os mecanismos envolvidos com a atividade antinociceptiva dos extratos.

Para avaliar a atividade antiedematogênica dos extratos brutos de *Plathymenia reticulata* foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina. A carragenina, polissacarídeo sulfatado, desencadeia uma inflamação aguda associada a hiperalgesia envolvendo liberação sequencial de vários mediadores inflamatórios, como radicais livres do oxigênio, óxido nítrico, histamina, serotonina, cininas, prostaglandinas, tromboxanos e citocinas (Winter e col., 1962; Sammons, 2000; Gualillo, 2000).

Os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) de *P. reticulata* promoveram uma inibição do edema de pata (de maneira dose dependente) principalmente após 4 e 5 horas da administração do agente flogístico. O extrato bruto acetato de etila (EBAE) não foi ativo neste modelo.

A interpretação do edema como sinal de inflamação deve ser considerada cuidadosamente, pois sua formação depende da perfusão vascular do tecido avaliado, da pressão sanguínea sistêmica e dos níveis de glicocorticóides circulantes, podendo também determinar o aparecimento de resultados falsos positivos (Rates e Barros, 1994).

Para avaliar a influência dos glicocorticóides endógenos na atividade antiedematogênica do EBHF, foi realizado o ensaio de edema de pata em animais adrenaectomizados. É conhecido que os processos inflamatórios ativam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), aumentando os níveis de glicocorticóides na circulação sistêmica (Romay e col., 1998). Os resultados demonstram que o EBHF manteve a atividade no modelo de edema de pata, confirmando sua ação antiedematogênica.

Os resultados discutidos até aqui indicam a participação de substâncias polares no efeito antiedematogênico de *P. reticulata*. Por este motivo, o EBHF foi escolhido para iniciar o processo de fracionamento. As frações FB e FN de *P. reticulata*, apesar de inibirem o edema de pata após 4 e 5 horas da administração do agente flogístico, apresentaram efeito menor quando comparado aos resultados obtidos com o EBHF. Este fato sugere que as

substâncias responsáveis pela atividade antiedematogênica podem estar divididas entre as frações FB e FN. A fração FA não foi ativa neste modelo.

Outro ensaio utilizado para a avaliação da atividade antiedematogênica foi o edema de orelha induzido por óleo de cróton. O óleo de cróton induz uma dermatite sensível à ação de antiinflamatórios de uso tópico, mas responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais. (Tubaro, 1985; Segura, 1998). Neste modelo, os extratos brutos (EBHQ e EBHF) de *P. reticulata* administrados por via oral não foram ativos quando comparados à dexametasona, controle positivo do experimento que inibiu o edema de orelha em 85%.

A atividade do EBHF sobre a migração leucocitária foi estudada no ensaio de peritonite induzida por carragenina em camundongos. Este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente leucotrieno B₄ (Bastos e col, 2001).

A administração oral do EBHF reduziu o número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal, seguindo perfil semelhante ao da dexametasona. A indometacina, antiinflamatório não esteroidal, também reduziu a migração leucocitária em 67%.

O mecanismo de ação da carragenina em induzir a migração leucocitária pode ser por sinergismo entre prostaglandinas, LTB₄ e outros potentes agentes quimiotáticos, como complemento (C5a) e interleucinas (IL-8), promovendo vasodilatação, exsudação

plasmática e acúmulo de leucócitos nos locais de lesão. É possível então que os FAINES, ao inibirem a síntese de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE₂), promovam redução do fluxo sanguíneo comprometendo a migração leucocitária para a área de reação inflamatória (Foster e col, 1986).

Estes resultados demonstram a atividade antiinflamatória dos extratos hidroalcoólicos de *P. reticulata* e indicam que esta ação pode estar relacionada com a inibição da ciclooxigenase (COX), enzima responsável pelo metabolismo do ácido araquidônico e síntese de prostanóides.

Com o objetivo de avaliar a relação entre as substâncias que inibem a expressão da COX e a atividade citocida ou citostática em células tumorais, as atividades dos extratos e frações foram avaliados em cultura de células tumorais humanas comparativamente à indometacina, antiinflamatório não esteroideal e um dos mais potentes inibidores da ciclooxigenase *in vitro* (Vane, 1970; Ochi e col, 2000).

A ciclooxigenase existe sob duas formas: COX-1 e COX-2. A COX-1 é encontrada em muitas células como enzima constitucional, regulando respostas vasculares e coordenando as ações de hormônios circulantes. Já a COX-2 é induzida em células inflamatórias. Vários trabalhos têm demonstrado a participação da aspirina na redução dos riscos de câncer de cólon intestinal (Masferrer e col, 2000). Novos estudos *in vitro* e *in vivo* tentam avaliar o mecanismo de ação antiproliferativo dos inibidores específicos da COX-2, provavelmente relacionado à indução da apoptose celular e o bloqueio da produção de PGE₂, mediador

inflamatório com papel importante no crescimento e manutenção de tumores, por induzir a angiogênese responsável pelo suprimento de oxigênio e nutrientes às células neoplásicas (Masferrer e col, 2000; Liu e col, 2000, Sjö Dahl, 2001).

A metodologia de triagem antiproliferativa *in vitro*, preconizada pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos e utilizada neste trabalho, permite a avaliação das substâncias em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a descoberta de drogas com maior especificidade. Outra vantagem é a rapidez, eficiência e reprodutibilidade dos resultados (Skehan e col, 1990).

A indometacina apresentou efeito citostático (inibição do crescimento) para todas as linhagens e citocida (morte celular) principalmente para linhagens de melanoma (UACC-62), rim (786-0), próstata (PCO-3), além de ovário (OVCAR) e pulmão (NCI-460).

O EBHF apresentou seletividade para a linhagem de ovário (OVCAR) e pulmão (NCI-460) com efeito citostático na concentração de 25 µg/mL e citocida na mais elevada. Para as linhagens de cólon (HT 29) e rim (786-0) o EBHF produziu apenas inibição de crescimento celular.

As frações obtidas do EBHF de *P. reticulata* também foram submetidas ao ensaio antiproliferativo. A análise dos resultados revelou que as frações ativas no modelo de edema de pata induzido por carragenina (FB e FN) apresentaram atividade semelhante, com efeito citostático para todas as linhagens celulares e citocida apenas para NCI-460

(pulmão), OVCAR-03 (ovário) e UACC-62 (melanoma). Este fato é interessante, já que a quimioterapia atual está deficitária em drogas para tratamento de tumores sólidos. A fração FA não foi ativa neste modelo. Os resultados obtidos demonstraram uma correlação entre a atividade antiproliferativa e antiinflamatória. Desta forma, essa metodologia poderá ser útil para o monitoramento do processo de isolamento e identificação dos princípios ativos, pois não necessita de quantidades elevadas dos mesmos.

O extrato bruto acetato de etila (EBAE), apesar de não ter atividade no modelo de edema de pata, também foi avaliado *in vitro*, demonstrando seletividade para a linhagem de mama (MCF-7), com efeito citostático para linhagem de cólon (HT 29) na concentração de 25µg/mL e citocida na maior concentração. Para as demais linhagens, o EBAE apresentou efeito citostático ou citocida somente na concentração mais elevada (250 µg/mL). Este fato indica que as substâncias responsáveis por este resultado são de média polaridade e apresentam mecanismo de ação antiproliferativo independente da atividade antiinflamatória.

Com o objetivo de melhor caracterizar a influência dos extratos brutos de *P. reticulata* sobre a síntese de prostaglandinas, foram também utilizados modelos agudos de nocicepção (químico e térmico). É conhecido que a analgesia moderada produzida pelo ácido acetilsalicílico e pela indometacina é explicada pela inibição da atividade da ciclooxigenase e redução da síntese de prostaglandinas, que potencializam a ação de mediadores álgicos endógenos nas terminações nervosas nociceptivas durante o processo inflamatório (Vane, 1971).

A nocicepção induzida experimentalmente varia com o grau de consciência do animal e também com a presença de outras aferências sensoriais como o ambiente agressivo, as baixas temperaturas, o estresse ou a irritação do animal produzida por extratos vegetais contendo saponinas e taninos, quando injetados por via subcutânea ou intraperitoneal. Além disso, a maioria dos métodos de avaliação experimental da dor envolve uma resposta motora dos animais, de tal forma que os resultados falso positivos podem ser obtidos caso os extratos ou compostos testados produzam sedação e imobilização dolorosa, comprometendo a motricidade (Rates e Barros, 1994).

Um dos modelos químicos de nocicepção escolhido foi o das contorções abdominais em camundongos. Este teste baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (*writhing*) como respostas reflexas à irritação produzida pela injeção intraperitoneal de ácidos fracos ou outros agentes inflamatórios (Siegmund e col, 1957).

Neste teste, a reação dolorosa é sensível a drogas com atividade analgésica semelhante à aspirina, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos opióides de ação central e periférica (Siegmund e col, 1957; Ochi e col, 2000).

A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético ocorre, provavelmente, pela liberação de mediadores álgicos endógenos, principalmente bradicinina, histamina, serotonina e as prostaglandinas que, através da estimulação das terminações nociceptivas, desencadeariam

a sensação dolorosa (Matsumoto e col, 1998; Ribeiro e col, 2000). Entretanto, devido à baixa especificidade da resposta antinociceptiva neste teste, ensaios complementares são necessários para a interpretação dos resultados, pois vários compostos como anti-histamínicos, parassimpaticomiméticos, estimulantes do sistema nervoso central, inibidores da MAO, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos podem também inibir as contorções (Rates e Barros, 1994).

Os resultados do presente estudo demonstraram que nesse modelo os extratos brutos hidroalcoólicos (EBHQ e EBHF) apresentaram atividade antinociceptiva semelhante, quando administrados pela via oral. Além disso, o EBHF foi efetivo de maneira dose – dependente, com inibição da nocicepção seguindo perfil semelhante ao da indometacina. O extrato bruto acetato de etila (EBAE) também foi avaliado neste modelo, mas não foi capaz de inibir as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

A atividade antinociceptiva dos extratos brutos hidroalcoólicos de *P. reticulata*, também foi estudada em camundongos, no teste da placa quente. Este modelo mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (Woolfe e col, 1994) sendo semelhante ao teste do *tail-flick* descrito por D'amour e Smith (1941). Estes ensaios são sensíveis a drogas opióides como a morfina, cuja atividade analgésica é mediada por receptores μ , δ e κ , distribuídos tanto periféricamente, como no sistema nervoso central (Elmer e col, 1998; Tornos e col, 1999).

O tratamento com o EBHF pela via intraperitoneal, utilizando a morfina como controle positivo do teste, mostrou um aumento do tempo de reação ao estímulo térmico de maneira dose - dependente.

Para avaliar uma possível ação central e melhor caracterizar a atividade antinociceptiva do extrato bruto (EBHF) de *P. reticulata*, utilizou-se o teste da formalina em camundongos, um modelo químico de nocicepção, que fornece uma resposta mais específica comparativamente ao modelo do ácido acético (Tjølsen e col, 1992). Descrito originalmente em gatos e ratos, o teste da formalina foi posteriormente adaptado para camundongos (Hunnskaar e col, 1986) e consiste na injeção subcutânea de formaldeído na pata posterior direita. Imediatamente após a aplicação, a estimulação de fibras nervosas nociceptivas aferentes produz dor intensa, revelada por lambidas, repetidas mordidas e sacolejos vigorosos da pata injetada. A aplicação do agente irritante na pata posterior torna a resposta nociceptiva mais específica pois o animal, durante o *grooming*, utiliza mais frequentemente as patas anteriores (Tjølsen e col, 1992).

Em roedores, o teste da formalina caracteriza-se por apresentar duas fases distintas de nocicepção:

- na primeira fase que se inicia após a injeção da formalina e estende-se durante os primeiros 5 minutos, ocorre a produção da dor neurogênica, possivelmente através da estimulação direta de terminações aferentes nociceptivas. A participação de mediadores periféricos como a substância P, a bradicinina, a histamina e a serotonina é bem comprovada. Na medula, a mediação ocorre principalmente através de substância P e

glutamato. Esta fase é inibida por agonistas opióides, como o fentanil e morfina, e por antagonistas de receptores de bradicinina B1 e B2 (Hunskaar e col, 1986; Hunskaar e col, 1987).

- a segunda fase coincide com o aparecimento da dor de origem inflamatória. Ela ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina e está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a histamina, a serotonina, as prostaglandinas e a bradicinina. Esta fase é sensível aos antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais e aos analgésicos opióides de ação central ou periférica (Hunskaar e col, 1985; Hunskaar e col, 1987).

A estimulação nociceptiva prolongada pode produzir a facilitação da transmissão dolorosa, podendo esta permanecer ativa além do período de estimulação. Tal fenômeno é decorrente do aumento da sensibilidade das terminações nociceptivas periféricas (sensibilização periférica) e do aumento da excitabilidade dos neurônios dorsais medulares no SNC (sensibilização central) (Rang e Dale, 1999). Isto ocorre, após a injeção de formalina, quando tal agente é capaz de induzir um processo nociceptivo persistente (dor de origem inflamatória) subsequente a uma resposta nociceptiva aguda (dor de origem neurogênica). Como mecanismo geral, a estimulação nociceptiva promoveria a liberação de substância P e aminoácidos excitatórios, como o glutamato, de neurônios aferentes da medula dorsal. A associação da despolarização produzida pela substância P e dos potenciais excitatórios sinápticos rápidos produzidos pelo glutamato, agindo nos receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol), promove desinibição dos receptores NMDA (N-metil-D-

aspartato) bloqueados por magnésio. A ativação dos receptores NMDA promoverá o influxo de cálcio, ativação da síntese de prostanóides e óxido nítrico nas células do corno dorsal que, uma vez difundindo-se para fora destas células, aumentariam a excitabilidade dos neurônios medulares (Hunskaar e col, 1987; Rang e Dale, 1999; Carr e Goudas, 1999).

Deste modo, a substância P e os aminoácidos excitatórios liberados na medula a partir das fibras C-aférentes durante a primeira fase de reação dolorosa induzida pela formalina promoveriam a ativação de receptores NMDA. A conseqüente sensibilização dos neurônios espinhais por liberação do óxido nítrico e prostaglandinas levariam a sensibilização central e hiperalgesia manifestadas durante a segunda fase (Wiertelak e col, 1994; Carr e Goudas, 1999).

O pré-tratamento pela via oral com o EBHF obtido das cascas de *P. reticulata*, na dose que produziu efeito antinociceptivo máximo no modelo das contorções abdominais, reduziu a dor neurogênica e a inflamatória induzidas pela formalina. A indometacina reduziu apenas a dor de origem inflamatória.

Como o EBHF apresentou atividade antinociceptiva na primeira fase de dor induzida pela formalina, sua atividade foi avaliada no modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina. A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida) é o princípio pungente de uma grande variedade de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*. Uma vez injetada na região intraplantar da pata posterior direita de camundongos, promove uma reação nociceptiva monofásica, com características semelhantes à dor de origem neurogênica induzida pela

formalina (Sakurada e col, 1992). Tal processo ocorre por liberação de neuropeptídeos como a substância P, neurocininas, somatostatina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGPR) com participação de fibras aferentes nociceptivas do tipo C, e em parte, fibras do tipo A delta. A substância P, neurocinina A (NKA) e B (NKB) ativam três tipos de receptores designados como NK-1, NK-2 e NK-3, respectivamente. Desta forma, o processo nociceptivo induzido pela capsaicina tem sido relacionado à ativação do sistema taquicininérgico e parece ser mediado pela ativação de um receptor específico, cuja presença tem sido confirmada com a capsazepina, antagonista vanilóide competitivo (Szallasi e col, 1999; Laird e col, 2001; Lecci e col, 2001).

A administração oral prévia do EBHF (1000 mg/kg v.o.) reduziu a resposta álgica induzida pela capsaicina de maneira semelhante à morfina, analgésico opióide utilizado como controle positivo do teste.

Utilizando o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético para estudo do provável mecanismo de ação antinociceptivo do EBHF, foi verificado que o pré-tratamento com naloxona, um clássico antagonista de receptor opióide, não modificou a atividade do EBHF, quando comparado à morfina. Em condições experimentais semelhantes, a administração prévia de naloxona quaternária, antagonista opióide periférico, bloqueou o efeito antinociceptivo do EBHF. A escolha da loperamida como controle positivo foi baseada nos estudos de Reichert e col. (2001). Neste trabalho, os autores afirmam que o hidrocloreto de loperamida interage primariamente com receptores opióides periféricos.

Entretanto, nossos resultados demonstraram que a atividade analgésica da loperamida não foi alterada pelo antagonismo periférico.

Estes dados sugerem um possível envolvimento do sistema opioidérgico periférico na atividade antinociceptiva do EBHF. Tradicionalmente, o efeito dos agonistas opióides é explicado por ação no sistema nervoso central, como ocorre com o fentanil ou morfina. Entretanto, mecanismos periféricos na atividade analgésica da morfina passaram a ser evidenciados e caracterizados através da aplicação tópica destes agentes ou com a utilização de análogos quaternários de agonistas ou antagonistas opióides (n-metilmorfina e n-metilnalorfina). Estes agentes, com mínima capacidade de transpor a barreira hematoencefálica, parecem exercer o efeito analgésico através da interação com receptores opióides presentes nas terminações nociceptivas periféricas (Stein e col, 1989; Reichter e col, 2001).

Os resultados apresentados nos modelos de algesia são de grande interesse pois a busca de drogas antinociceptivas com mecanismo de ação periférico poderá fornecer uma nova alternativa para o tratamento medicamentoso da dor, evitando os efeitos colaterais e a dependência que aparecem com usos dos analgésicos opióides. A continuidade deste trabalho terá como objetivo isolar e identificar os princípios ativos responsáveis pelas ações observadas.

Conclusões

- O Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHF) de *Plathymenia reticulata* possui atividade antiinflamatória independente da liberação de glicocorticóides adrenais.
- A atividade antiproliferativa do EBH em cultura de células tumorais humanas foi semelhante à observada com a indometacina e pode estar relacionada com a inibição da COX-2.
- EBAE possui atividade antiproliferativa apesar de não apresentar ação antiinflamatória.
- EBH de *Plathymenia reticulata* possui efeito antinociceptivo por ação antiinflamatória e, provavelmente por ação em receptores periféricos.
- Triagem fitoquímica preliminar identificou antocianinas, taninos, saponinas e flavonóides no extrato ativo.

Summary

Plathymentia reticulata (Leguminosae), known popularly as “vinhático” grows in dry regions of Central Brazil. The cold infusion of the stems are used by folk medicine to treat inflammatory processes. Plant material was collected from Senador Canedo city (Goiânia State/ Brazil). The lack of information on the medicinal use of *P. reticulata* prompted us to study *P. reticulata* crude hydroalcoholic extract obtained from cold (EBHF) and hot (EBHQ) extractions, crude ethyl acetate extract (EBAE) and isolated fractions on inflammation, nociception and cancer experimental models.

The phytochemical screening of hydroalcoholic extracts revealed presence of flavonoids, tannins, antocyanins and saponins. The EBHF was partitioned in order to obtain an acid (FA), basic (FB) and neutral (FN) fractions.

One of the models chosen to study the anti-inflammatory activity was the carrageenan paw edema induced in rats. In this assay, only the hydroalcoholic crude extracts (EBHF and EBHQ) promoted an edema inhibition mainly after 4 and 5 hours of carrageenan administration. Adrenalectomy of animals one week before the rat mice paw inflammation model did not influence the antiedematogenic effect of EBHF. The FB and FN fractions of *P. reticulata* reduced the edematogenic response by 34% and 37% from 4th hour and 26% and 45% from 5th hour, respectively, after carrageenan injection. The EBHQ and EBHF antiedematogenic activity was also tested on mice croton oil ear edema. Under these conditions, dexamethasone inhibited very effectively the edema (85%), contrasting with crude hydroalcoholic extracts, which did not show a significant effect. Previous treatment with EBHF also reduced the leucocyte infiltration in the peritonitis induced by carrageenin by 60%. The effect was similar to that produced by dexamethasone (75%) and indomethacin (67%) used as positive control.

These results suggest a possible influence of hydroalcoholic crude extracts in the synthesis of prostaglandins.

Antiproliferative activity was tested employing an *in vitro* assay using human cancer cell lines. The results were detected with Sulforhodamine B assay (SRB). The crude hydroalcoholic extract and fractions (FB and FN) gave cytostatic inhibition with 25 µg/mL and cytotoxic inhibited at 250µg/mL with melanoma (UACC-62), ovarian (OVCAR) and lung (NCI460) cell lines. Indomethacin gave cytostatic inhibition from concentration at 25 µg/mL and cytotoxic inhibited at 250µg/mL with lung (NCI460), prostate (PCO₃), melanoma (UACC-62) and renal (786-0) cell lines. The results demonstrated a straight correlation among the antiproliferative and anti-inflammatory activity, probably related with inhibition of the enzyme COX-2.

The crude ethyl acetate extract (EBAE) showed selectivity for breast (MCF-7) cell line, cytostatic inhibition from 25 µg/mL and cytotoxic inhibited at 250µg/mL with colon (HT29) cell line. For the other cell lines, the EBAE only presented cytostatic or cytotoxic effect in the highest concentration. This result points to the presence of substances with antiproliferative action independent of the anti-inflammatory activity.

In chemical model of nociception, pretreatment of mice with the crude hydroalcoholic extracts produced a dose-related inhibition of the number of writhes induced by acetic acid. On the hot plate test in mice, EBHF increased the time of animal reaction after 60 and 90 minutes. This result indicated possible participation of central or peripheral analgesic mechanisms. The formalin test was used to characterize the antinociceptive activity of the crude extract (EBHF) of *P. reticulata*. Under this model, the previous oral treatment reduced the nociceptive response induced by formalin during the

first phase (neurogenic pain) by 46% and during the second phase (inflammatory pain) by 55%. Indomethacin, used as positive control, only reduced the last phase by 76%. On the neurogenic pain induced by capsaicin, pretreatment of mice with EBHF reduced the nociceptive response by 72% as morphine, an opioid analgesic used as positive control.

The acetic acid-induced writhing was used to determine the possible mechanisms involved in the antinociceptive activity of EBHF. Previous administration of naloxone inhibited the antinociceptive effects induced by morphine, while it did not affect the effect of EBHF. Previous administration of quaternary naloxone blocked the antinociceptive effect induced by EBHF. These data suggest a possible peripheral action in the antinociceptive activity of EBHF.

*Referências
Bibliográficas*

- Amann, R., Schuligoi, R. Inhibition of carrageenan-induced edema by indomethacin or sodium salicylate does not prevent the increase of nerve growth factor in the rat hind paw. **Neuroscience Letter** **278**: 173-176, 2000.
- Bakker, R.A; Wieland, K; Timmerman, H; Leurs, R. Constitutive activity of the histamine H₁ receptor reveals inverse agonism of histamine H₁ receptor antagonists. **Europ J Pharmacol** **387**: R5-R7, 2000.
- Bastos, J.K; Carvalho, J.C; Souza, G.H.B; Pedrazzi, A.H.P; Sarti, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **J Ethnopharmacol** **75**: 279-282, 2001.
- Belch, J.J.F.; Hill, A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. **Am J Clin Nutr.** **71**: 352S-6S, 2000.
- Botting, R.M. Mechanism of Action of Acetaminophen: Is There a Cyclooxygenase-3? **Clinical Infectious Diseases** **31**: S202-10, 2000.
- Brooks, P.M., Day, R.O. COX-2 inhibitors. **MJA** **173**: 433-436, 2000.
- Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality, control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.** **33**: 179-189, 2000.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J., Campos, M.M. Kinins in pain and inflammation. **PAIN** **87**:1-5, 2000.
- Carr, D.B; Goudas, L.C. Acute Pain. **Lancet** **353**: 2051-2058, 1999.
- Carvalho J.E. Fitoterápicos: Alimentos ou Medicamentos? *In*: Ciência de Alimentos – avanços e perspectivas. Campinas, SP. Vol. II, pp 196-201, 2001.

- Chang, J. Medicinal Herbs: Drugs or Dietary Supplements ? **Biochemical Pharmacology** **59**: 211-219, 2000.
- Cirino, G. Multiple controls in inflammation. **Biochemical Pharmacology.**, **55**:105-111, 1998.
- Coltren, H.R. Tissue-specific regulation. **J. Appl. Physiol.**, **72(1)**:1-7, 1992.
- Colville, P.R., Gilroyb, D.W. COX-2 and the cyclopentenone prostraglandins – a new chapter in the book of inflammation ? **Prostaglandins & Other Lipid Mediators** **62**: 33-43, 2000.
- Cordell, G.A. Pharmacognosy – New roots for an old science. *In*: RAHMAN, A.-U., BASHA, F.(Eds). Bioactive natural products. Amsterdan: Elsevier
- Cragg, G. M., Newman, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agentes from Natural Sources. **Cancer Investigation**, **17(2)**, 153-163, 1999.
- Cragg, G.M., Newman, D.J., Snader, K.M. Natural products in drug discovery and development. **J. Nat. Prod.** **60**: 52-60, 1997.
- D'amour, F.E., Smith, J. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **72**: 74-79, 1941.
- Dolan, S., Field, L.C., Nolan, A.M. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. **PAIN** **86**:311-320, 2000.
- Dworski, R., Sheller, J.R. Differential sensitives of human blood monocytes and alveolar macrophages to the inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by IL-4. **Prostaglandins** **53**: 237-251, 1997.

- Elmer, G.I., Pieper, J.O., Negus, S.S., Woods, J.H. Genetic variance in nociception and its relationship to the potency of morphine-induced analgesia in thermal and chemical tests. **PAIN 75**:129-140, 1998.
- Fellows, L. E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects *In*: Coombs, J.D.,ed. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services, 1992:93.
- Ferrándiz, M. L. and Alcaraz, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and actions 32**: 283-288,1991.
- Ferreira, F., Vásquez, A., Guntner, C., Moyna, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguayensis* St. Hil. Saponons. **Phitoterapy Res. 11**: 79-81, 1997.
- Ferri, M. G. *Plantas do Brasil. Espécies do cerrado*. Editora Edgard Blücher. São Paulo. p.12-13, 1969.
- Foster, S.J; McCormick, M.E; Howarth, A; Aked, D. Leukocyte Recruitment In The Subcutaneous Sponge Implant Model Of Acute Inflammation In The Rat Is Not Mediated By Leukotriene B₄. **Biochem Pharmacol 35** (10): 1709-1717, 1986.
- Foxwell, A; Kyd, J.M; Cripps, A.W. Programmed inflammatory process induced by mucosal immunisation. **Vaccine 19**: 2522-2526, 2001.
- Fraser, D. Animal ethics and animal welfare science: bridging the two cultures. **Applied Animal Behaviour Science 65**: 171-189, 1999.
- Gaulejac, N.S.C., Glories, Y., Vivas, N. Free Radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. **Food Research International 32**: 327-333, 1999.

- Goumas, G; Tentolouris, C; Tousoulis, D; Stefanadis, C; Toutouzas, P. Therapeutic modification of the L-arginine - eNOS pathway in cardiovascular diseases. **Arteriosclerosis** **154**, 255-267, 2001.
- Gualillo, O., Eiras, S., Lago, F., Diéguez, C., Casanueva, F.F. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. **Life Sciences** **67**: 2433-2441, 2000.
- Hamburger, M., Hostettmann, K. Bioactivity In Plants: The Link Between Phytochemistry And Medicine. **Phytochemistry** **30**: 3864-3874, 1991.
- Hattori, R; Muraki, S; Yoshida, T. Chemical Composition of the Absolute from Gardenia Flower. **Agric Biol Chem** **42** (7): 1351-1356, 1978.
- Hawkins, C., Hanks, G.W. The Gastroduodenal Toxicity of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. A Review of the Literature. **J. Pain Symptom Management** **20**: 140-151, 2000.
- Hebert, M.K; Just, H; Schmidt, R.F. Histamine excites groups III and afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neuroscience Letters** **305**: 95-98, 2001.
- Hevko, J.M; Murphy, R.C. Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry of Cysteinyl Eicosanoids: Leukotriene C₄ and FOG₇. **J Am Soc Mass Spectrom** **12**: 763-771, 2001.
- Hunnskaar, S. and Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **PAIN** **30**: 103-114, 1987.

- Hunnskaar, S; Berger, O.G; Hole, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain** **25**: 125-132, 1986.
- Hunnskaar, S; Fasmer, O.B; Hole, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci Meth** **14**:69-76, 1985.
- Jagels, M.A., Daffern, P.J., Hugli, T.E. C3a e C5a enhance granulocyte adhesion to endothelial and epithelial cell monolayers: epithelial and endothelial priming is required for C3a-induced eosinophil adhesion. **Immunopharm** **46**: 209-222, 2000.
- Janero, D.R. Nitric Oxide (NO)-Related Pharmaceuticals: Contemporary Approaches to Therapeutic no Modulation. *Free Radical Biology & Medicine* **28**: 1495-1506, 2000.
- Jansen-Olesen; Ottosson, A.; Cantera, L.; Strunk, S.; Lassen, L.H.; Olessen, J.; Mortensen, A.; Engel, U.; Edvinsson, L. Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human arteries and detection of mRNA encoding H₁ and H₂-receptors by RT-PCR. **British Journal of Pharmacology** **121**: 41-48, 1997
- Kam, P.C.A., See, A. U-L. Cyclooxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia** **55**: 442-449, 2000.
- Kilgore S., Ward P.A., Warren J.S. Neutrophil adhesion to human endothelial cells is induced by the membrane attack complex: The role of P-selectin and platelet activating factor. **Inflammation.**, **22**:583-597, 1998.
- King, F. E., King, T. J., Neill, K. G. The chemistry of extractives from hardwoods. **J. Chem. Soc.** 1055-9, 1953.
- Koster, R., Anderson, M.& De Beer, E. J. Acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** **18**: 412, 1959.

- Laird, J.M.A; Roza, C; Felipe, C. De; Hunt, S.P; Cervero, F. Role of central and peripheral tachykinin NK1 receptors in capsaicin-induced pain and hyperalgesia in mice. **Pain** **90**; 97-103, 2001.
- Langenbach, R., Loftin, C., Lee, C., Tiano, H. Cyclooxygenase Knockout Mice – Models for elucidating isoform specific functions. **Biochem. Pharmacol.** **58**: 1237-1246, 2000.
- Laskin, D.L.; Laskin, J.D. Role of macrophages and inflammatory mediators in chemically induced toxicity. **Toxicology** **160**: 111-118, 2001.
- Lecci, A. Antinociceptive and pro-inflammatory roles for NPY Y1 receptors. **Trends in Pharmacological Sciences** **22 (5)**: 221, 2001.
- Lima, F.E., Bogliolo, L. Inflamações. Texto de patologia por Bogliolo cap. 7, p. 111-142. Etiopatogênese geral das doenças cap.3, pp 20-45, 1994.
- Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Lee, R., Holland, J.F., Levine, A.C. Inhibition of Cyclooxygenase-2 supresses angiogenesis and The Growth Of Protate Cancer In Vivo. **J. Urology** **164**: 820-825, 2000.
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B..S., Settle, S.L., Woerner, M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., Seibert, K. Antiangiogenic and Antitumor Activities of Cyclooxygenase-2 Inhibitor. **Cancer Research** **60**: 1306-1311, 2000.
- Matos, F. J. A., Craveiro, A. A., Demaurera, M. Furan Diterpenes of the *Plathymenia* genus. **J.Nat.Prod.** **47**:(4) 581-584, 1984.

- Matsukawa, A., Yoshinaga, M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. **Inflamm. Res.** 47: (Suppl. 3) S137-S144, 1998.
- Matsumoto, H., Naraba, H., Ueno, A., Fujiyoshi, T., Murakami, M., Kudo, I., Oh-ishi, S. Induction of cyclooxygenase-2 causes enhancement of writhing response in mice. **Europ. J. Pharmacol.** 352: 47-52, 1998.
- Mayers I., Johnson D. The nonspecific inflammatory response to injury. **Can J Anaesth.** 45(9): 871-879, 1998.
- Mazella, A. A. G., Oliveira, A. A. M., Silva, F. B., Caldeira, T. T. O. & Sertié, J. A. A. Atividade antiinflamatória tópica de *Cordia verbenacea* (CV) e sua toxicidade. Anais da VI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Resumo 06.33, p. 284, 1991.
- Medeiros, R; Cabrini, D; Calixto, J.B. The “in vivo and “ex vivo” roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor- κ B and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor- mediated contraction of the rabbit aorta. **Regulatory Peptides** 97:121-130, 2001.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implication for Inflammation, Heart Disease and Cancer. **Pharmacological Reviews** 52: 673-751, 2000.
- Monsinjon, T; Gasque, P; Ischenko, A; Fontaine, M. C3A binds to the seven transmembrane anaphylatoxin receptor expressed by epithelial cells and triggers the production of IL-8. **FEBS Letters** 487: 339-346, 2001.

- Mors, W. B., Pellegrino, J., Santos Filho, M. F. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.) contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, **38**: 325-330, 1966.
- Myers, C; Koki, A; Pamukcu, R; Wechter, W; Padley, R. Proapoptotic Anti-Inflammatory Drugs. *Urology*, **57** (Suppl 4A): 73-76, 2001.
- Nakahara, H., Izushi, K., Sugimoto, Y., Watanabe, Kamei, C. Vascular permeability in allergic conjunctivitis in mice lacking histamine H₁ receptors. **European Journal of Pharmacology** **409**:313-317, 2000.
- Norlén, P., Lindstron, E., Zhao, C.M., Kitano, M., Chen, D., Andersson, K., Hakanson, R. α -Fluoromethylhistidine depletes histamine from secreting but not from non-secreting rat stomach ECL cells. **Euro. J. Pharmacol.** **400**: 1-10, 2000.
- Ochi, T., Motoyama, Y., Goto, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **Euro. J. Pharmacol.** **391**: 49-54, 2000.
- Okabe, T.; Hide, M; Koro, O.; Yamamoto, S. Substance P induces tumor necrosis factor-release from human skin via mitogen-activated protein Kinase. **European Journal of Pharmacology** **389**: 309-315., 2000.
- Oketani, K.; Nagakura, N.; Harada, K.; Inoue, T. In vitro effects of E3040, a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane A₂ synthetase, on eicosanoid production. **European Journal of Pharmacology** **422**: 209-216, 2001.
- Opal, S.M., DePalo, V.A. Anti-Inflammatory Cytokines. **CHEST** **117**: 1162-1172, 2000.

- Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A., Darley, V.M.
Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim. Biophys. Acta** **1411**: 385-400,
1999.
- Phillipson, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry** **56**: 237-243, 2001
- Pio Corrêa, M. Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Inst. Bras.
Desenv. Florestal. Rio de Janeiro. Vol. V, 1969.
- Porter, D.G. Ethical scores for animal experiments. **Nature** **356**: 101-102, 1992.
- Pozetti, G. L., Bernardi, A. C. Contribuição ao estudo químico de *Brosimum gaudichaudii*
Trec. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, v.5, n.2,
189-193, 1971.
- Rang, H.P.; Dale, M.M. & Ritter, J.M. Fármacos Analgésicos. In: Pharmacology. 4rd ed.
Churchill Livingstone. New York, USA, pp. 485-505, 1999.
- Rates, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon** **39**: 603-613, 2001
- Rates, S.M.K., Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para
triagem de novos analgésicos. *Ver. Bras. Farm.* **75(2)**:31-34, 1994.
- Reichert, J. A.; Daughters, R. S.; Rivard, R; Simone, D. A. Peripheral and preemptive
opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**: **89 (2-3)** 221-227, 2001.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B.P., Poole, S., Ferreira, S.H.,
Cunha, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing
nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Europ. J.**
Pharmacol. **287**: 111-118, 2000.
- Roitt I. Essential Immunology. **Blackwell Scientific Publication**. 1994.

- Romay, C. Ledón, N., González, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycoyanin in some animal models of inflammation. **Inflamm. Res.**, 47: 334-338, 1998.
- Sakurada, T., Katsumata, K., Tan-no, K., Sakurada, S. and Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology** 31(12): 1279-1285, 1992.
- Sammons, M.J., Raval, P., Davey, P.T., Rogers, D., Parsons, A.A., Bingham, S. Carrageenan-induced thermal hyperalgesia in the mouse: role of nerve growth factor and the mitogen-activated protein kinase pathway. **Brain Res.** 876: 48-54, 2000.
- Schaefer, U., Schneider, A., Rixen, D., Neugebauer, E. Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediated via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. **Inflamm. Res.** 47: 256-264, 1998.
- Schwartz, L.B. Mast Cells: function and contents. **Current Opinion in Immunology** 6: 91-97, 1994.
- Segura, L., Vila, R., Gupta, M.P., Avella, M.E., Adzet, T., Cañigüeral, S. Antiinflammatory activity of *Anthurium cerrocampaense* Croat in rats and mice. **J. Ethnopharmacol.** 61: 243-248, 1998.
- Shiantarelli, P., Cadel, S., Acerbi, D. & Pavesi, L. Antiinflammatory activity and bioavaiiability of percutaneous piroxican. **Arzneim.Forsch/Drug Research**,32(3): 230-235,1982.
- Siegmund, E., Cadmus, R., Lu, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** 95: 729, 1957.
- Sim, E. Complement.**Blackwell Scientific Publication.**,13:155-169,1994.

- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 1999, pp 517 – 544.
- Sjödahl, R. Extent, Mode and Dose Dependence of Anticancer Effects. **Am J Med**, **110 (1A)**: 66S-69S, 2001.
- Skehan, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, **82(13)**: 1107-1112, 1990.
- Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.S. Peripheral opioids receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta e kappa receptors. **J Pharmacol. Exp. Ther.** **248**: 1269-1275, 1989.
- Szallasi, A; Blumberg, P.M. Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. **Pharmacol Rev** **51 (2)**: 159-211, 1999.
- Tiemann, U.; Tomek, W.; Schneider, F.; Wollenhaupt, K.; Kanitz, W.; Becker, F.; Pöhland, R.; Alm, H. Platelet-activating factor (PAF)-like activity, localization of PAF receptor (PAF-R) and PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) activity in bovine endometrium at different stages of the estrous cycle and early pregnancy. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators** **65**: 125-141, 2001.
- Tjølsen, A; Berge, O; Hunskaar, S; Rosland, J.H, Hole, K. The formalin test: na evaluation of the method. **Pain** **51**: 5-17, 1992.
- Tornos, M.P., Sáenz, M.T., García, M.D., Fernández, M.A. Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys* **J. Ethnopharmacol.** **68**: 229-234, 1999.
- Tozer, M.J; Buck, I.M; Cooke, T; Kalindjian, S.B; McDonald, I.M; Pether, M.J; Steel, K.I.M. 4-Chlorobenzyl Sulfonamide and sulfamide derivatives of histamine

- homologues: the design of potent histamine H₃ receptor antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **9**: 3103-3108, 1999.
- Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C. and Loggia, R. D. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions** **17**:347-349,1985.
- Vacher, P. J., Duchéne-Marullaz, P., Barbot, P. A proposde quelques produits usuels - comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **Med. Exp.** **11**: 51-58,1964.
- Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature New Biol.** **5**: 231-235, 1971.
- Vane, J.R., Botting, R.M. Antiinflammatory drugs and their mechanism of action. **Inflamm. Res.** **47**: (Suppl. 2) S78-S87, 1998.
- Waigh, R. D. The chemistry behind atracurium. **Chem Britain** , **24**: 1209-12, 1988.
- Whelton, A. Renal Aspects of Treatment with Conventional Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Versus Cyclooxygenasw-2-Specific Inhibitors. **Am J Med** **110** (3A): 33S-42S, 2001.
- Wiertelak, E.P; Furness, L.E. Horan, R; Martinez, J; Maier, S.F; Watkins, L.R. Subcutaneous formalin produces centrifugal hiperalgesia at a non -injected site via NMDA-nitric oxide cascade. **Brain Res** **649**: 19-26, 1994.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R., Gilroy, D. Resolution of inflammation. **Intern. J. Immunopharm** **22**: 1131-1135, 2000.
- Winter, C. A., Risley,E. A. & Nuss,G. W. Carregeenin induced edema in the hind paw of the Rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc. of the Soc. Exp. Biol**,**3**: 544-547,1962.

- Woolfe, G.; MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** **80**: 300-307, 1944.
- Yedgar, S., Lichtenberg D., Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A₂ as a therapeutic target. **Biochem. Biophys. Acta** **1488**: 182-187, 2000.
- Youdim, K.A., Martin, A., Joseph, J.A. Incorporation of the Elderberry Anthocyanins by Endotelial Cells Increases Protection Against Oxidative Stress. **Free Radical Biology & Medicine** **29**: 51-60, 2000.
- Zimmermann, K.C., Sarbia, M., Weber, A.A., Borchard, F., Gabbert, H.E., Schor, K. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Esophageal Carcinoma. **Cancer Research** **59**: 198-204, 1999.