

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CIÊNCIAS CLÍNICAS**

DISSERTAÇÃO

**Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico
das partes aéreas da *Cleome spinosa* Jacq (St. hil.) (mussambê)
e de compostos flavonóides isolados**

Raquel Teixeira Ferreira

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico
das partes aéreas da *Cleome spinosa* Jacq (St. hil.) (mussambê)
e de compostos flavonóides isolados**

RAQUEL TEIXEIRA FERREIRA

Sob a orientação do Professor
Frederico Argollo Vanderlinde

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, Área de
Concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ
Setembro de 2011

DEDICATÓRIA

*Dedico à minha mãe todo este trabalho, pois foi com ela
que aprendi a ter perseverança, dedicação e paciência
necessários para seguir em frente, sempre!!!
Te amo muito mãe!!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Marcos, e minha mãe, Jandira, em primeiro lugar, que me deram a vida e me permitiram passar por experiências maravilhosas, sem as quais todo este trabalho não seria possível. Por provarem, mais do que nunca, que a distância não é suficiente para afastar aqueles que realmente amamos.

Aos meus avós maternos, Wilma e Nelson, por serem mais do que essenciais no carinho, nas “recomendações” e ensinamentos que só avós são capazes de transmitir!

À minha avó paterna, Carmem, que mesmo longe (e agora olhando por mim no céu) sei que vibraria com mais esta vitória.

À minha irmã Rafaela, que apesar de todos os desencontros e contratempos sempre será minha melhor amiga, companheira e confidente. Por me apoiar por mais errada que eu estivesse, estressada em meio a gráficos, figuras e tabelas... E por dar à luz o ser mais lindo e puro deste mundo, minha linda sobrinha Isadora!

Ao meu segundo pai, George, que em momento mais do que oportuno surgiu em nossas vidas para que o destino seguisse seu curso. Por me apoiar sempre e me ajudar nos momentos de aperto.

Ao meu namorado, amigo, companheiro, confidente, Nemilson de Souza (Itto), que me proporcionou momentos de carinho e paciência extrema, descontração quando era necessário, apoio em todas as etapas deste trabalho e de minha vida assim que passou a fazer parte dela. Por ser mais um pedacinho de mim... essencial !!

Aos meus amigos, que compreenderam minha ausência, quase que diária, de eventos e momentos especiais... E juntamente, à internet que nos fez aproximar em momentos que a presença física não era possível.

Aos colegas de laboratório, funcionários e professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, que estiveram sempre dispostos a ajudar no que fosse necessário para que meu desempenho fosse o melhor possível.

Ao Vicente, técnico de laboratório, pelas broncas, dicas, conselhos, ajuda mais que essencial! A esta pessoa super humana, dedicado, prestativo, amigo, terceiro pai!!

À Priscila Pires e ao Felipe Marques, também orientados pelo Mestre Frederico, meus amigos e espelhos, que me socorreram nas aflições das tarefas durante o mestrado pelas quais já haviam passado, sempre pacientes e dando o apoio que só amigos de verdade podem fazer! Obrigada Mestres!

À Paloma Helena Sanches Silva, aluna de iniciação científica, pela dedicação oferecida em todos os momentos, tanto para as tarefas mais simples até as mais elaboradas. Tornou-se para mim mais uma grande amiga!

Às funcionárias da secretaria do PPGMV, Lorena e Regina, por estarem sempre com um sorriso no rosto e à disposição para me ajudar no que fosse necessário, inclusive em seus horários de almoço.

À professora Maria Aparecida Medeiros Maciel, pelo fornecimento do material fitoquímico, e pelo pronto auxílio para melhor compreensão desta etapa do projeto.

Ao professor João Ernesto de Carvalho, por aceitar participar de minha banca, fazendo apontamentos mais do que necessários e oferecendo parte de seu conhecimento para engrandecer e aprimorar minha dissertação.

Ao professor Elson Alves Costa, mestre Xico, por me acolher no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da UFG, e mais do que isso, por me acolher em sua casa como uma “filha emprestada” vinda do “Rio”. A este grande Mestre, sem o qual não seria possível ter chegado até aqui com a bagagem de conhecimento que cheguei, e por aprender a trabalhar não só com a mente, mas principalmente com o coração.

Aos orientados do professor Elson: Iziara Ferreira Florentino (iniciação científica) e Adriane Ferreira de Brito (mestrado). Sem elas a execução de boa parte dos experimentos não seria possível. Obrigada pelo companheirismo e acolhimento durante todo o mês de julho de 2011, quando estive longe de casa para concluir esta importante etapa do mestrado. E aos meninos, José Luis Rodrigues Martins e James Oluwagbamigbe Fajemiroye, também mestrados e figuras essenciais para a execução dos experimentos, responsáveis pelos momentos de risos e descontração quando o cansaço tomava conta durante um dia inteiro de trabalho no laboratório.

Ao meu orientador, Mestre Frederico, no qual me espelhei profissionalmente, buscando melhorar a cada apresentação de seminários e trabalhos durante estes 2 anos de mestrado. Por ser uma eterna fonte de conhecimento, por me guiar meu aprendizado, aconselhar minhas tomadas de decisões, me apoiar e incentivar a cada resumo que era escrito, a cada slide que era apresentado... e principalmente, por me ensinar a caminhar sozinha!! Muito obrigada!!!

RESUMO

FERREIRA, Raquel Teixeira. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* Jacq (St. hil.) (mussambê) e dos compostos flavonóides isolados.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

A *Cleome spinosa* (Brassicaceae), popularmente conhecida como mussambê ou sete-marias, tem o chá de suas raízes utilizado no combate de processos inflamatórios, tosse, asma ou bronquite, e o sumo das folhas em otites e feridas. A eficácia da espécie no tratamento das bronquites asmáticas foi caracterizada, bem como foram isolados diterpenos, flavonóides, catequinas, chalconas e alcalóides de seus extratos. Alguns flavonóides apresentaram atividades anti-oxidante, antifúngica, antibacteriana, antimutagênica e anti-espasmódica. Considerando estes indicativos e utilizando metodologias farmacológicas, esse trabalho avaliou o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* (EMCS) e dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, administrados pela via oral, e mecanismos de ação envolvidos. Na avaliação antinociceptiva pelo teste da formalina em camundongos, evidenciou-se que o EMCS (1g/kg) reduziu o tempo de reatividade dos animais na 1ª (60,8%) e na 2ª fase (81,5%), sugerindo o envolvimento de mecanismos de ação central e anti-inflamatória na antinocicepção. Pelo método de *Hargreaves*, essa mesma dose do EMCS inibiu a dor incisional em ratos na segunda etapa (3º dia) do experimento, nos tempos de 3, 6, 9 e 12 horas após o tratamento, com inibição da hiperalgesia térmica de até 44,9%. De maneira semelhante, no teste de *von Frey*, ocorreu redução da alodinia mecânica nos tempos de 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas, com inibição máxima de 29,6%, bem como no 7º, 10º e 14º dias. Na avaliação anti-inflamatória através do teste da pleurisia induzida por carragenina em camundongos, o EMCS (1g/kg) foi capaz de reduzir a migração leucocitária (37,1%), bem como o extravasamento protéico para a cavidade pleural (32,1%). Estas propriedades anti-inflamatórias do EMCS foram confirmadas através da dosagem *ex vivo* (ELISA) do TNF- α no exsudato obtido da pleurisia, observando-se redução de 29,8% na concentração deste mediador inflamatório. A participação dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e/ou F₁₁₋₁₃ na efetividade antinociceptiva e anti-inflamatória do EMCS foi investigada. No teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, o F₁₀₋₁₆ (0,5; 1 e 2mg/kg) reduziu de maneira dose dependente as contorções (ID₅₀=1,47mg/kg). Na formalina, a administração dos compostos F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (2mg/kg) inibiu a 2ª fase de nocicepção em 51,4 e 38,7% respectivamente. Nos testes da pleurisia e do edema de pata por carragenina em camundongos, o F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (2mg/kg) inibiram a migração leucocitária (42,7% e 39,0%) e a formação do edema em até 47,1% e 43,7% respectivamente, reduzindo também a concentração de TNF- α em 8,5% (F₁₀₋₁₆) e 11,5% (F₁₁₋₁₃). Na avaliação *in vitro* (ELISA) da influência dos flavonóides (6,75 a 200 μ g/mL) na atividade das cicloxigenases 1 e 2, o F₁₁₋₁₃ apresentou inibição preferencial da COX-1 enquanto que o F₁₀₋₁₆ inibiu seletivamente a COX-2. Na fosfolipase A₂, os flavonóides (1mg/mL) inibiram 34,6% (F₁₁₋₁₃) e 16,7% (F₁₀₋₁₆) a atividade da enzima. Esses resultados indicam que a antinocicepção do EMCS envolve mecanismos anti-inflamatórios, através da inibição de enzimas responsáveis pela síntese de mediadores pró-inflamatórios e com a participação dos compostos flavonóides nesta efetividade, podendo estes resultados explicar algumas das indicações populares da *Cleome spinosa*.

Palavras-chave: *Cleome spinosa*, antinociceptivo, anti-inflamatório.

ABSTRACT

FERREIRA, Raquel Teixeira. **Antinociceptive and anti-inflammatory effect of methanolic extract obtained from aerial parts of *Cleome spinosa* Jacq (St. Hil.) (mussambê) and isolated flavonoids compounds.** 2011. 91f. Dissertation (Master of Science in Veterinary Medicine, Clinical Science). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Cleome spinosa (Brassicaceae) is popularly known as mussambê or sete-marias. The tea of its roots is used to treat of inflammatory processes, cough, asthma and bronchitis, and the juice of the leaves to ear infections and wounds. The effectiveness of this species in treatment of asthmatic bronchitis was characterized, and from their extracts diterpenes, flavonoids, catechins, chalcones and alkaloids were isolated. Some flavonoids showed anti-oxidant, antifungal, antibacterial, antimutagenic and anti-spasmodic activity. Considering these indications and using pharmacological methodologies, this study evaluated the antinociceptive and anti-inflammatory potential of the methanolic extract from aerial parts of *Cleome spinosa* (EMCS) and flavonoids compounds F₁₀₋₁₆ and F₁₁₋₁₃, orally administered, and the mechanisms of action involved. In the antinociceptive evaluation through the formalin test in mice, the EMCS (1g/kg) reduced the reactivity of animals in the 1st (60.8%) and 2nd phases (81.5%), suggesting the involvement of central and anti-inflammatory mechanisms in the antinociception. In the *Hargreaves* method, the same dose of EMCS inhibited the incisional pain in rats in the 2nd stage (3rd day) of the experiment, at 3, 6, 9 and 12 hours after treatment, with maximum inhibition of thermal hyperalgesia of 44,9%. Similarly, in *von Frey* test, the reduction in mechanical allodynia occurred 1, 3, 6, 9, 12 and 24 hours, with maximum inhibition of 29,6%, as well in the 7, 10 and 14 days. In anti-inflammatory evaluating with carrageenan-induced pleurisy test, the EMCS (1g/kg) was able to reduce leukocyte migration (37.1%), as well as protein leakage to pleural cavity (32.1%). The anti-inflammatory properties of EMCS were confirmed through *ex vivo* dosage (ELISA) of TNF- α present in exudate obtained from pleurisy test, with concentration reduction (29.8%) of this inflammatory mediator. The flavonoids (F₁₀₋₁₆ and/or F₁₁₋₁₃) involvement of antinociceptive and anti-inflammatory activity of EMCS was investigated. In the writhing test (acetic acid in mice), the F₁₀₋₁₆ (0.5, 1 and 2 mg/kg) produced dose-related inhibition of writhing (ID₅₀= 1.47 mg/kg). In formalin test, the administration of F₁₀₋₁₆ or F₁₁₋₁₃ (2mg/kg) inhibited the 2nd phase of nociception at 51.4 and 38.7% respectively. In carragenan-induced pleurisy and paw edema tests in mice, the F₁₀₋₁₆ or F₁₁₋₁₃ (2mg/kg) inhibited leukocyte migration (42.7% and 39.0%) and edema formation by up to 47.1% and 43.7% respectively, also reducing the concentration of TNF- α by 8.5% (F₁₀₋₁₆) and 11.5% (F₁₁₋₁₃). The *in vitro* evaluation (ELISA) of flavonoids (6,75 to 200 μ g/mL) influence of cyclooxygenase 1 and 2 activity, the F₁₁₋₁₃ showed preferential inhibition of COX-1, while F₁₀₋₁₆ selectively inhibited COX-2. In the phospholipase A₂ assay, flavonoids (1mg/mL) inhibited 34.6% (F₁₁₋₁₃) and 16.7% (F₁₀₋₁₆) the enzyme activity. These results indicate that the EMCS antinociception involves anti-inflammatory mechanisms, through inhibiting of enzymes responsible for synthesis of pro-inflammatory mediators, with the participation of flavonoids compounds in this effectiveness. These results may explain some of the popular indications of *Cleome spinosa*.

Key-words: *Cleome spinosa*, antinociceptive, anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: Graus Celsius
Δ: Variação
μL: Microlitro
μg: Micrograma
5-HT: 5-hidroxitriptamina (Serotonina)
a.C.: Antes de Cristo
AA: Ácido aracdônico
Ag: Antígeno
AMPc: AMP cíclico
Aβ: A beta
Aδ: A delta
BK: Bradicnina
¹³C: Carbono 13
Ca²⁺: Íon cálcio
CCD: Cromatografia em camada delgada
CCF: Cromatografia em camada delgada de sílica
Cg: Carragenina
CGRP: Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CINC-1: Quimiocina quimioatraente de neutrófilos 1
CINC-1/CXCL-1: Quimiocina de ratos, análoga a IL-8 em humanos
CO₂: Gás carbônico
COX: Cicloxigenase
COX-1: Cicloxigenase 1
COX-2: Cicloxigenase 2
COX-3: Cicloxigenase 3
CPME: Substância cinzenta da medula espinhal
CS: *Cleome spinosa*
DNA: Ácido desoxiribonucléico
EMCS: Extrato metanólico da *Cleome spinosa*
EPM: Erro padrão da média
F₁₀₋₁₆: Flavonóide (2S)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavanona
F₁₁₋₁₃: Flavonóide 5,4'-diidroxí-3,7,3'-trimetoxiflavona
FPL: Funículo póstero-lateral
g: Grama
GIEMCS: Grupo incisado tratado com extrato metanólico da *Cleome spinosa*
GIV: Grupo incisado veículo
GNIV: Grupo não incisado veículo
h: Hora
¹H: Íon hidrogênio
H₂O: Água
HOX = Hidroperoxidase
i.p.: Intraperitoneal
IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor
IC₅₀: Concentração inibitória 50%
ID₅₀: Dose inibitória 50%
IFN-γ: Interferon γ
IHM: Índice de hipernocicepção mecânica

IHT: Índice de hiperalgesia térmica
IL: Interleucina
IL-1: Interleucina 1
IL-1 β : Interleucina 1-beta
IL-2: Interleucina 2
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
iNOS: Óxido nítrico sintase induzida
I κ B: Inibidor do fator de transcrição NF κ B
K⁺: Íon potássio
KC: Quimiocina derivada de queratinócitos
kg: Quilograma
LC: *Locus coeruleus*;
LOX: Lipoxigenase
LPS: Lipopolissacarídeo Bacteriano
m/s: Metros por segundo
MeOH: Metanol
mg: Miligrama
min: Minuto
MIP-2: Proteína inflamatória dos macrófagos 2
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mm²: Milímetro quadrado
NaCl: Cloreto de sódio
Neurônios T: Trigger cells ou gatilho
NF κ B: Fator de transcrição NF κ B
nm: Nanômetro
NMR: Núcleo magno da rafe
NO: Óxido nítrico
NRPG: Núcleo reticular paragigantocelular
NSP: Nociceptores sensitivos primários
p.o.: Via oral
pg: Picograma
PGE₂: Prostaglandina E₂
PGG₂: Prostaglandina G₂
PGH₂: Prostaglandina H₂
PGI: Prostaciclina
pH: Potencial de hidrogênio
PLA₂: Fosfolipase A₂
PMA: Acetato de miristato de forbol
RMN: Ressonância magnética nuclear
s: Segundos
s.c.: Subcutâneo
SCPA: Substância cinzenta periaquedutal
SOD: superóxido dismutase
SP: Substância P
TNFR1: Receptor de TNF, tipo 1
TNFR2: Receptor de TNF, tipo 2
TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1: Receptor de TNF, tipo 1

TNFR2: Receptor de TNF, tipo 2
TPA: 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato
TXA₂: Tromboxano A₂
TXB₂: Tromboxano B₂
UI: Unidade internacional
UV: Ultravioleta
UV-B: Ultravioleta B
v/v: Volume por volume
WDR: Wide dynamic range neurons

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Plantas Medicinais	2
2.1.1 Histórico	2
2.1.2 Plantas como fonte de medicamentos	5
2.2 A família Brassicaceae / Capparaceae e o Gênero <i>Cleome</i>	7
2.2.1 Constituintes químicos do gênero <i>Cleome</i>	9
2.3 Flavonóides	10
2.4 Inflamação	12
2.4.1 Fisiopatologia da inflamação	13
2.4.2 O ácido aracdônico e as prostaglandinas	15
2.4.3 Citocinas e quimiocinas	17
2.4.3.1 TNF- α	19
2.4.4 Cicloxigenase (COX)	20
2.5 Dor	22
2.5.1 Fisiopatologia da dor	22
2.5.2 Dor incisional	25
2.5.3 Mecanismos de modulação da dor	28
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Animais	29
4.2 Material Botânico	30
4.3 Drogas, Reagentes e solventes	30

4.4 Obtenção do Extrato e dos Flavonóides	30
4.5 Métodos Farmacológicos	33
4.5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva	33
4.5.1.1 Teste da formalina	33
4.5.1.2 Modelo dor Incisional - Delineamento experimental	33
4.5.1.2.1 Avaliação da Hiperálgia Térmica (Teste de <i>Hargreaves</i>)	35
4.5.1.2.2 Avaliação da Alodinia Mecânica (Teste de <i>von Frey</i> eletrônico)	36
4.5.1.3 Teste da das contorções abdominais induzidas por ácido acético	36
4.5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória em camundongos	37
4.5.2.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina	37
4.5.2.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina	37
4.5.3 Avaliação de mecanismos de ação	38
4.5.3.1 Dosagem <i>ex vivo</i> de TNF- α	38
4.5.3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	38
4.5.2.5 Ensaio enzimático da fosfolipase A ₂	38
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 RESULTADOS	40
6.1 Avaliação da atividade antinociceptiva do EMCS	40
6.1.1 Teste da formalina	40
6.1.2 Modelo de dor incisional em ratos	41
6.1.2.1 Avaliação da hiperálgia térmica (Teste de <i>Hargreaves</i>)	41
6.1.2.2 Avaliação da alodinia mecânica (Teste de <i>von Frey</i> eletrônico)	44
6.2 Avaliação da atividade antinociceptiva dos flavonóides F ₁₀₋₁₆ e F ₁₁₋₁₃	46
6.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	46
6.2.2 Teste da formalina	47
6.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EMCS	48
6.3.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina	48

6.4 Avaliação de mecanismos de ação do EMCS	50
6.4.1 Dosagem <i>ex vivo</i> de TNF- α	50
6.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos flavonóides F ₁₀₋₁₆ e F ₁₁₋₁₃	51
6.5.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina	51
6.5.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina	52
6.6 Avaliação de mecanismos de ação dos flavonóides F ₁₀₋₁₆ e F ₁₁₋₁₃	56
6.6.1 Dosagem <i>ex vivo</i> de TNF- α	56
6.6.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade enzimática de COX-1 e COX-2	57
6.6.3 Ensaio enzimático da fosfolipase A ₂	61
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÕES	71
9 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

Apesar de haver atualmente uma predominância de substâncias sintéticas utilizadas no arsenal terapêutico, vem ocorrendo a retomada à valorização de práticas terapêuticas consideradas como populares ou não científicas. Dentre as causas que podem explicar o crescimento da utilização de produtos originários de plantas medicinais estão: a ineficiência da medicina convencional, o uso abusivo e incorreto dos medicamentos sintéticos, a valorização de hábitos saudáveis com conseqüente redução de efeitos colaterais pelo uso de produtos “naturais”, a descoberta de novos princípios bioativos naturais e a comprovação científica da presença de atividades farmacológicas de espécies vegetais, possibilitando gerar novas formulações fitoterápicas.

A espécie *Cleome spinosa* (CS) é popularmente conhecida como mussambê, sete-marias e beijo-fedorento. As folhas e raízes desta espécie são utilizadas na medicina tradicional para diversos fins terapêuticos, dentre eles: anti-escorbútico, anti-helmíntico, tratamento de infecções, tratamento de inflamação das articulações, redução de otites supuradas, tratamento de bronquites asmáticas, larvicida e antimicrobiana.

O processo inflamatório é caracterizado por um conjunto de alterações bioquímicas e celulares, através das quais o organismo tenta se defender de agentes agressores e reparar tecidos lesados. Dentre os eventos mais importantes e característicos da inflamação estão a vasodilatação local, o aumento da permeabilidade vascular, a infiltração leucocitária e de células do sistema fagocitário mononuclear. A partir de um trauma tissular são liberadas diferentes citocinas, dentre as quais podemos destacar o fator de necrose tumoral alfa, que promove diversas mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais, induzindo a expressão de moléculas de adesão e a liberação de outras citocinas como a interleucina 1-beta e a interleucina 8. A interleucina 1-beta promove a ativação da enzima ciclooxigenase, a qual é responsável pela produção de prostaglandinas e tromboxanos.

A dor, que constitui um dos sinais cardeais de inflamação, é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial. Pode ser considerada de caráter aguda ou crônica, estando relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias. O estímulo inflamatório ou a lesão tecidual irão promover a liberação de citocinas, que disparam a liberação dos mediadores finais, que são prostanoídes e aminas simpatomiméticas, responsáveis pela resposta de dor. A dor incisional pós-operatória é uma forma particular de dor aguda, e vem sendo estudada extensivamente através de modelos experimentais, que permitem a avaliação da alodinia mecânica e da hiperalgesia térmica.

Considerando que a maior parte do uso de plantas com objetivos medicinais é fundamentada no empirismo, a busca de novas descobertas sobre as atividades medicinais de diferentes espécies através de trabalhos científicos torna-se um campo cada vez mais promissor. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* (EMCS) e dos compostos flavonóides (F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃) isolados deste extrato, utilizando modelos de dor e inflamação em ratos e camundongos, bem como buscar possíveis mecanismos de ação envolvidos com essas atividades através de métodos *ex vivo*, que quantificaram a citocina fator de necrose tumoral alfa, e métodos *in vitro*, a fim de avaliar a influência sobre as atividades das enzimas ciclooxigenases (1 e 2) e da fosfolipase A₂ (PLA₂).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas Medicinais

Plantas medicinais são aquelas que têm atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos, úteis à saúde humana, sendo muitas utilizadas atualmente como cosméticos, com denominação de cosmeceúticos. Os fitoterápicos ou fitomedicamentos são produtos originados exclusivamente de material botânico integral ou de seus extratos, usados com o propósito de tratamento médico (FERREIRA et al., 1998). O fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações técnico-científicas em publicações ou ensaios clínicos de fase 3 (BRASIL, 2010). Os fitoterápicos podem ser divididos em plantas medicinais e extratos de plantas. Os fitofármacos são substâncias medicamentosas isoladas de extratos de plantas, como a rutina e a pilocarpina, que são alguns dos raros fitofármacos produzidos no Brasil (FERREIRA et al., 1998).

A fitoterapia é a ciência que estuda a utilização de produtos de origem vegetal com finalidades terapêuticas, sendo para prevenir, atenuar ou curar um estado patológico. A palavra fitoterapia é formada por dois radicais gregos: fito vem de “*phyton*” que significa planta, e terapia vem de “*therapia*”, que significa tratamento, ou seja, tratamento em que se utilizam plantas medicinais (FERREIRA et al., 1998). O princípio da fitoterapia está baseado na alopatia, diferenciando-se apenas pelo uso de preparados tradicionais padronizados, eficazes, com qualidade controlada, elaborados de plantas medicinais e não de substâncias quimicamente definidas, isoladas, purificadas e de estrutura molecular definida (DI STASI, 1995).

Apesar do avanço da tecnologia, que diariamente sintetiza novos compostos e substâncias sintéticas com poderes medicinais, mais de 40% de toda matéria-prima de medicamentos encontrados hoje nas farmácias continua sendo de origem vegetal. Visando garantir a qualidade dos produtos fitoterápicos desde a matéria-prima até o produto acabado, assegurando ao consumidor produtos padronizados em condições apropriadas para o uso, o Ministério da Saúde do Brasil, por intermédio da Secretaria de Vigilância Sanitária, publicou a Portaria nº 06 de 31 de janeiro de 1995. Ela instituiu e normalizou no país tanto o registro de fitoterápico, quanto à regulamentação dos procedimentos de sua produção (MIRANDA, 2001).

Embora a fabricação de fitoterápicos pela indústria brasileira esteja fundamentada somente no uso popular das plantas, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica, o Brasil possui ainda uma grande chance de participação no mercado da fitoterapia (YUNES et al., 2001). Isto é possível devido à sua vasta biodiversidade e tradição no uso de plantas medicinais, que fornecem subsídios para a implementação de práticas de alta tecnologia e competência dentro do mercado da indústria farmacêutica nacional, além de buscar a possibilidade de redução de custos se comparado aos fármacos obtidos por síntese (CALIXTO, 1996).

2.1.1 Histórico

A utilização de plantas na prevenção e cura de doenças é muito antiga e data dos primórdios da civilização, e muitas delas foram ou ainda são utilizadas com diversos fins terapêuticos (MESQUITA, 2002), fazendo parte de sistemas da medicina tradicional amplamente utilizada por vários grupos étnicos (GURIB-FAKIM, 2006). Na verdade, a utilização de recursos naturais provavelmente antecede o *Homo sapiens* moderno, tendo sido

encontradas evidências em escavações do Paleolítico mostrando que o conhecimento de plantas medicinais existe pelo menos há 60.000 anos (SUMNER, 2000). Pólen e fragmentos de flores de diversas plantas foram encontrados no sítio arqueológico do homem de Neanderthal no Iraque. Dentre as espécies identificadas, estavam: *Ephedra*, *Centaurea*, *Senecio*, *Althea* e *Achillea* (TYLER, 2000).

Investigações científicas demonstram que, entre os anos de 5.000 a 2.800 a.C., o homem domesticava animais, cultivava cereais e utilizava algumas plantas medicinais. Por instinto, observando pássaros e outros animais, o homem selecionou e experimentou vegetais com finalidade terapêutica, verificando o poder curativo de certas ervas (CARVALHO, 2004).

Em uma época conhecida pelos chineses como período Sheng Nung (2.800 a.C.), após o desenvolvimento de uma sociedade agrária, foi descoberto que a ingestão de plantas poderia ser útil na cura de certas doenças. Neste período, centenas de plantas foram experimentadas e o povo da época aprendeu como utilizá-las, evitando as substâncias venenosas. Existem relatos citando pessoas que utilizaram essas plantas e viveram mais de 70 anos (HUANG, 1999).

Os antigos babilônicos, egípcios e tantos outros povos no passado faziam uso de minerais e de plantas medicinais (LIMA, 1994). Os antigos egípcios, que se desenvolveram na arte de embalsamar os cadáveres para preservá-los da deterioração, experimentaram muitas plantas e descobriram inúmeros poderes curativos. O critério de escolha das plantas baseava-se em seu aroma, acreditando-se que afugentavam os espíritos das enfermidades. Plantas não aromáticas também eram utilizadas pelos egípcios, destacando-se a papoula, a cila e a babosa (MACIEL, 1997).

No papiro de Edwin Smith (1700 a.C.) estão descritos tratamentos dos feridos de guerra com a aplicação de uma combinação de mel e unguentos sobre as feridas (LIMA, 1994). No papiro de Ebers (1555 a.C.), do Egito Antigo, estão relacionadas 160 plantas, muitas das quais ainda em uso atualmente (SANTOS, 1998). Crateus (século I a.C.) publicou a primeira obra que se tem conhecimento na história – o *Rhizotomikon* – sobre plantas medicinais (MACIEL, 1997). O rei assírio Assurbanipal foi tido como um sábio de sua época, e deixou blocos relacionando trezentas plantas medicinais, como o ópio e a mirra. Neste bloco, expôs diversas receitas e referências a vários medicamentos que os médicos dispunham na época: heléboro, meimandro, mandrágora, papoula, cânhamo, canela, assa-fétida, mirra, timo, salgueiro, figo, tâmara, leite, peles de serpentes, carapaças de tartarugas, cloreto de sódio e salitre entre cerca de 250 plantas medicinais, 120 substâncias minerais e 180 de origem animal (CARVALHO, 2004).

Em todas as partes do mundo, povos indígenas descobriram e desenvolveram o uso medicinal de plantas nativas, mas foi com as plantas medicinais utilizadas na medicina da Grécia antiga que as bases da medicina ocidental se estabeleceram (KONG et al., 2003). Hipócrates (460-377 a.C.), da Grécia, considerado o pai da medicina, acreditava que as doenças eram o resultado de um desequilíbrio dos humores corporais (SUMNER, 2000). Ele utilizou e catalogou centenas de drogas de origem vegetal (CARVALHO, 2004).

Theophrastus (371-287 a.C.) considerado “o pai da botânica”, foi estudante de Platão e Aristóteles e escreveu extensivamente sobre plantas. Ele determinou as peculiaridades e qualidades médicas das ervas, observando cuidadosamente os aspectos farmacêuticos e farmacológicos da mirra, do incenso, da cássia, do mentrasto, da beladona e do timo. Seu trabalho “*Historia Plantarum*” englobava a coleta e o preparo de plantas medicinais, condimentos e plantas e foi utilizado como uma confiável fonte de referência durante 2000 anos (SUMNER, 2000).

Com o declínio da cultura grega, durante o Império Romano, os tratamentos voltaram mais uma vez a ser uma mistura de magia e religião, influenciando o desenvolvimento da medicina ocidental através das escrituras romanas (KONG et al., 2003).

Somente com os estudos de Pedânio Dioscórides (40-90 d.C.), durante o reinado de Nero, foi observado um avanço nos estudos das plantas medicinais (YAMADA, 1998). As propriedades, usos e cultivos de 600 plantas medicinais foram reunidos no “*De Materia Medica*” no primeiro século depois de Cristo. Viajando como cirurgião junto com o exército de Nero, ele pôde espalhar suas experiências com as plantas medicinais européias. Dioscórides defendeu o uso do salgueiro no tratamento da gota, prática que seria utilizada para o tratamento da dor nos próximos séculos, antecedendo o uso da aspirina que seria utilizada em 1899 pela companhia alemã Bayer. O “*De Materia Medica*” foi usado como fonte de referências nos 15 séculos seguintes, sendo considerado uma referência-padrão na Idade Média, época em que os médicos adquiriram pouco conhecimento adicional sobre plantas medicinais (SUMNER, 2000).

Por volta de 1545, surgia na Europa o primeiro jardim destinado exclusivamente ao estudo e à produção de plantas medicinais, na Escola Médica de Pádua, na Itália. No final do século XVI, esses jardins encontravam-se distribuídos por toda a Europa (YAMADA, 1998).

William Withering foi o primeiro médico a investigar cientificamente um remédio popular. Seus estudos (1775-1785) sobre o uso da dedaleira (*Digitalis purpurea*) no tratamento da falência cardíaca congestiva fixaram um padrão para a química farmacêutica (KONG et al., 2003).

A noção básica do entendimento de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica e a resposta terapêutica como potencial característico de uma certa espécie vegetal é acreditada por Paracelso. Este físico suíço pode ser considerado o introdutor de substâncias químicas no preparo de medicamentos, sob a forma de extratos alcoólicos e de tinturas, com utilização do ópio, do enxofre, do mercúrio, do ferro, do arsênico, do sulfato de cobre, do sal. Pode ser considerado, portanto, como um verdadeiro farmacologista. No início do século XVI, começou a praticar a extração de substâncias bioativas que foram denominadas “Quinta Essentia”, representando provavelmente a primeira noção de princípio bioativo (ALMEIDA, 2003).

No final do século XVIII, o progresso rápido das ciências modernas veio enriquecer e diversificar grandemente os conhecimentos sobre as plantas (CARVALHO, 2004).

Após a chegada de Cristóvão Colombo à América, muitas plantas no Novo Mundo tornaram-se disponíveis aos europeus (KONG et al., 2003). Com a chegada de Dom João VI ao Brasil, o naturalista francês Augustin François César Prouvençal de Saint-Hilaire (1799-1853), foi um dos primeiros cientistas estrangeiros a receber permissão da Coroa Portuguesa para percorrer livremente os territórios do Brasil colonial. Ele desembarcou no Rio de Janeiro em 1816 para coletar amostras da flora nativa. Saint-Hilaire era um crítico incansável sobre o modo destrutivo com que os brasileiros tratavam sua biodiversidade e apontou inúmeras sugestões de como se poderia melhor aproveitar os recursos naturais disponíveis. Em suas viagens, coletou 7 mil exemplares de plantas, sendo 4.500 delas desconhecidas na época (MATTOS, 1980). Seu nome tornou-se comum na descrição de diversas espécies, dentre elas: *Lafoensia pacari* Saint-Hilaire, *Solanum lycocarpum* A. Saint-Hilaire, *Anacardium humile* Saint-Hilaire, *Talauma ovata* Saint-Hilaire. A espécie *Cleome spinosa*, base deste estudo, foi uma das espécies coletadas por este viajante francês.

Com o progresso do conhecimento científico, ocorre uma divisão entre a medicina baseada no uso de plantas medicinais e a medicina tradicional (KONG et al., 2003). As primeiras substâncias químicas foram isoladas de extratos vegetais a partir do século XIX, quando várias substâncias bioativas foram isoladas (MACIEL et al., 2002a; 2002b). Friedrich Serturmer isolou a morfina da *Papaver somniferum* em 1806. Devido ao aumento do

conhecimento das substâncias químicas ativas, a primeira droga sintética baseada em um produto natural foi formulada em meados do século dezenove. Em 1839, o ácido salicílico foi identificado como substância ativa em várias plantas conhecidas por suas ações analgésicas, e foi pela primeira vez sintetizado em 1853 levando ao desenvolvimento da aspirina, que está entre os medicamentos sintéticos mais utilizados atualmente (KONG et al., 2003).

Vale ressaltar, que a primeira fonte para o desenvolvimento de medicamentos surgiu com a Farmacognosia, disciplina farmacêutica que proporcionou um novo aspecto ao estudo de plantas medicinais a partir do século XIX (CRAGG et al., 1997).

Atualmente, sabe-se que o poder das plantas é, na verdade, proveniente da sua composição e das características das substâncias que sintetizam. Entretanto, muito tempo se passou até que se reconhecesse a verdadeira origem do poder das plantas (YAMADA, 1998). A prática milenar da utilização de plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras durante o processo evolutivo e chegou até os dias atuais, sendo amplamente utilizada por grande parte da população mundial como fonte de recurso terapêutico eficaz (DI STASI, 1995).

2.1.2 Plantas como fonte de medicamentos

As plantas medicinais representam uma reserva praticamente inexplorada de substâncias úteis à humanidade. Das mais de 420 mil espécies vegetais conhecidas, muito poucas foram avaliadas quanto às suas atividades biológicas (BRAMWELL, 2000; VERPOORTE et al., 2000), significando que plantas medicinais ainda são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005).

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente (BALUNAS; KINGHORN, 2005) ou então serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (FABRICANT et al., 2001; VIEGAS et al., 2006). Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (CALIXTO, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2007). Dos 252 medicamentos considerados básicos e essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente originados de plantas e um número significativo são medicamentos sintéticos obtidos de precursores naturais (**Tabela 1**).

Atualmente, tem se verificado que apesar da predominância de substâncias sintéticas no arsenal terapêutico, vem ocorrendo a retomada à valorização de práticas terapêuticas consideradas como populares ou não científicas (CONTRERA et al., 1985), destacando-se os fitoterápicos, que são utilizados principalmente como anti-inflamatórios, analgésicos e cicatrizantes. Dentre as causas que podem explicar o crescimento da utilização de produtos originários de plantas medicinais, estão: a ineficiência da medicina convencional, o uso abusivo e incorreto dos medicamentos sintéticos (RATES, 2001), a valorização de hábitos saudáveis com consequente redução de efeitos colaterais pelo uso de produtos “naturais”, a descoberta de novos princípios bioativos naturais e a comprovação científica de espécies vegetais que geram novas formulações fitoterápicas (CONTRERA et al., 1985).

Tabela 1. Exemplos de alguns medicamentos obtidos a partir de plantas (adaptado de MANS et al., 2000).

MEDICAMENTOS DESENVOLVIDOS A PARTIR DE PLANTAS		
MEDICAMENTO	USO MÉDICO	PLANTA
ácido acetilsalicílico	analgésico, anti-inflamatório	<i>Salix alba</i>
atropina	dilatador de pupila	<i>Atropa belladonna</i>
benzoína	desinfetante oral	<i>Styrax tonkinensis</i>
cafeína	estimulante	<i>Camellia sinensis</i>
codeína	analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i>
digoxina	fibrilação atrial, ICC	<i>Digitalis purpurea</i>
eugenol	dor de dente	<i>Syzygium aromaticum</i>
hiosciamina	anticolinérgico	<i>Hyoscyamus niger</i>
morfina	analgésico	<i>Papaver somniferum</i>
papaverina	antiespasmódico	<i>Papaver somniferum</i>
pilocarpina	glaucoma	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
quinina	profilaxia da malária	<i>Cinchona pubescens</i>
reserpina	anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia serpentina</i>
escopolamina	distúrbios do movimento	<i>Datura stramonium</i>
toxiferina	relaxante em cirurgias	<i>Strychnos guianensis</i>
xantotoxina	vitiligo	<i>Ammi majus</i>

Observa-se que, principalmente entre populações de baixa renda de países em desenvolvimento, as quais têm pouco ou nenhum acesso aos medicamentos alopáticos, o uso de medicamentos tradicionais tornou-se uma prática corriqueira (OMS, 2002). Não obstante, a aceitação da medicina tradicional como uma forma de tratamento terapêutico tem aumentado entre todos os grupos sócio-econômicos, e a fitoterapia tem se tornado um importante setor econômico no Brasil (LIMA et al., 2006).

Apesar da transferência de conhecimento de uma geração à outra, a maior parte do uso de plantas medicinais é fundamentada no empirismo (OLIVEIRA, 2001). Muitas vezes, devido à crescente consciência ecológica (RATES, 2001), e tentando-se minimizar os desconfortáveis e até nocivos efeitos colaterais de fármacos sintéticos, nota-se um aumento na procura pelos produtos naturais (SANTOS, 1998). Contudo, é importante ressaltar que o uso indiscriminado de fitoterápicos torna-se um risco à população, visto que estes apresentam inúmeras propriedades terapêuticas, mas podem também ser dotados de grande toxicidade (OLIVEIRA, 2001).

O potencial das plantas como fonte de medicamentos é ainda pouco explorado. Estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de plantas no mundo, tendo sido realizados estudos fitoquímicos em apenas uma minúscula parcela. A análise fitoquímica de uma planta pode revelar apenas uma pequena porcentagem de seus constituintes, uma vez que as plantas contêm centenas ou milhares de metabólitos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991). Desta maneira, o número de trabalhos científicos em busca de novas descobertas e comprovação sobre as atividades de plantas medicinais, torna-se cada vez maior e mais promissor, sendo atualmente o grande alvo de companhias farmacêuticas e instituições de pesquisa (KONG et al., 2003).

Muitos fármacos analgésicos utilizados na medicina moderna foram descobertos a partir de espécies vegetais, os quais foram gerados durante a investigação de inúmeras plantas medicinais. Um grande exemplo destes compostos é a morfina, que foi isolada em 1806, pelo farmacêutico alemão Sertüner, como um composto ativo do ópio (*Papaver somniferum*). A morfina começou a ser utilizada por volta do ano de 1850 em pequenos procedimentos cirúrgicos, em situações de pós-operatório, para o tratamento da dor crônica e como adjuvante em anestésias gerais. Alguns anos mais tarde, a codeína foi também isolada do ópio, sendo um importante agente analgésico e antitussígeno utilizado na clínica médica atual (BROWNSTEIN, 1993; BENYHE, 1994).

A espécie *Cordia verbenacea* (erva baleeira) foi alvo de extensa investigação de suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, tendo originado o primeiro anti-inflamatório feito com base no extrato de uma planta nativa brasileira, conhecido como Acheflan[®]. Na forma de creme, o produto é indicado para dores musculares crônicas e para tendinites, e já pode ser comparado com o Cataflan[®] (diclofenaco), um outro anti-inflamatório considerado de referência para o mercado farmacêutico neste segmento.

Porém, o marco histórico no processo de desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta da salicina, utilizada como analgésico e antitérmico, por Rafaele Piria em 1829, obtida originalmente das cascas do tronco do salgueiro (*Salix alba*, Salicaceae) (VIEGAS et al., 2006; CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008). A partir da salicina foi realizada a primeira modificação estrutural, originando o ácido salicílico em 1839, utilizado no tratamento da artrite reumatóide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a Aspirina[®] (ácido acetilsalicílico) em 1897, sendo um dos fármacos anti-inflamatórios mais antigos e ainda utilizado na terapêutica médica atual. Esta espécie vegetal está entre outras 71 espécies relacionadas na RENISUS -Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (SUS) (RENISUS, 2009).

2.2 A família Brassicaceae / Capparaceae e o Gênero *Cleome*

A família Capparaceae é amplamente reconhecida por estar relacionada à família Brassicaceae, e vem sendo questionada em função de muitas espécies terem sido classificadas de maneira equivocada. Resultados recentes, baseados em dados de DNA desenvolvidos em cloroplastos, permitiram comprovar a filogenia entre as famílias Brassicaceae e Capparaceae. Estes estudos foram realizados de acordo com os critérios de monofilia (habitat, folhas, flores, estames e frutos) e permitiram o reconhecimento de ambas em uma só família (Brassicaceae) (HALL et al., 2002).

Atualmente, a família Brassicaceae compreende aproximadamente 4000 espécies distribuídas em 400 gêneros, resultado este em função da fusão com a família Capparaceae. A realização de análises filogenéticas usando morfologia e dados moleculares indicaram que algumas espécies do gênero *Cleome* mostravam-se intimamente relacionadas com a família Brassicaceae (RODMAN et al., 1998; HALL et al., 2002). Como exemplo, destaca-se a espécie medicinal *Cleome spinosa* Jacq., rica em flavonóides.

Como características botânicas da espécie, podemos citar que são ervas perenes que possuem folhas alternadas, podendo apresentar flores em ramos ou solitárias, em sua maioria actinomorfas (isto é, que apresentam semelhança morfológica entre si) e que se prolongam em um ginóforo ou androginóforo (porção reprodutiva). Possuem fruto do tipo síliqua de formato alongado, que se caracteriza por um fruto seco e deiscente, constituído por 2 carpelos. Os carpelos caracterizam-se como folhas modificadas que se fecham sobre os óvulos, formando o ovário. No interior dos frutos há um septo plano onde se inserem as sementes, em ambas as suas faces. Este septo, na abertura do fruto, destaca-se de ambos os carpelos, expondo as sementes (**Figura 1**) (BOELCKE; VIZINIS, 1987).

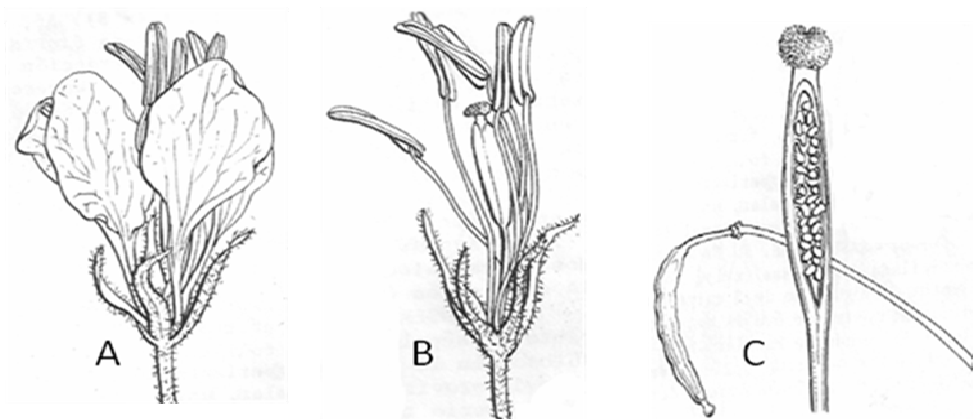


Figura 1. A) Flor de *Cleome* sp.; B) Flor sem pétalas, mostrando o ovário elevado por um ginóforo; C) Detalhe do ovário e fruto (BOELCKE; VIZINIS, 1987).

O gênero *Cleome*, que consta de 150 espécies, é formado por plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas, sendo vinte e oito destas nativas e amplamente distribuídas, preferencialmente em áreas abertas. São usadas com objetivos medicinais e ornamentais (PEREIRA et al., 2007) (**Figura 2**).



Figura 2. *Cleome spinosa* Jacq.

Como exemplos de espécies que são utilizadas na medicina tradicional destacam-se: *Cleome spinosa* Jacq, *Cleome rutidosperma* DC, *Cleome droserifolia* Forssk, *Cleome viscosa* L., *Cleome amblycarpa* Hassk, *Cleome africana* Botsch, *Cleome brachycarpa* Vahl ex DC, e *Cleome chrysantha* Decne.

De acordo com o uso tradicional, espécies do gênero *Cleome* são utilizadas como estimulantes, anti-escorbútico, anti-helmíntico e rubefaciente (BOSE et al., 2007). O extrato aquoso da espécie *C. rutidosperma* demonstrou atividades antibacteriana e diurética, sendo encontradas ainda atividades analgésica e depressora da atividade motora em outros extratos (metanol, clorofórmio e éter de petróleo) (BOSE et al., 2006; 2007). Os extratos clorofórmico, etanólico e aquoso de *C. droserifolia* mostraram-se eficazes na redução de índices glicêmicos; sendo confirmados efeitos adicionais para o extrato etanólico, como hepatoprotetor, anti-histamínico e diurético (EL-NAGAR et al., 2005; MOTHANA et al., 2008). A espécie *C. viscosa* é utilizada popularmente no combate à febre, inflamações, hepatopatias, bronquite,

diarréias e convulsões infantis. Seu extrato aquoso demonstrou atividade analgésica sem evidências de toxicidade (SING; WEST, 1991). As espécies *C. cynophallophora* e *C. spinosa* têm sido usadas para tratamento de infecções e inflamação das articulações (RIBEIRO, 1999).

A espécie *Cleome spinosa* é popularmente conhecida como mussambê, mussambê-branco, mussambê-miúdo, mussambê-de-espinho, sete-marias, planta-aranha e beijo-fedorento. Dentre as sinonímias botânicas utilizadas para descrever a mesma espécie, estão: *Cleome hasslerana*, *Cleome houtteana*, *Cleome pungens*, *Cleome arborea*, *Cleome pubescens*, *Cleome tonduzii* e *Tarenaya spinosa*.

As folhas e raízes de *Cleome spinosa* são utilizadas na medicina tradicional, sendo as folhas maceradas e aplicadas sobre a pele e agem como rubefacientes. Em infusão, são estomáquicas e estimulantes do aparelho digestivo, e são eficazes no combate a leucorréia. Utiliza-se o suco das folhas para a redução de otites supuradas e as raízes são eficazes no tratamento de bronquites asmáticas (COLLINS et al., 2004). Foi observado ainda, potencial citotóxico frente às larvas de *Aedes aegypti* quando foram testados extratos das raízes e das flores de *C. spinosa*, sugerindo possível atividade larvicida natural desta espécie. Em estudos *in vitro*, as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram sensíveis ao extrato etanólico das raízes da *C. spinosa*, indicando sua atividade antimicrobiana (SANTOS; MENEZES, 2005).

2.2.1 Constituintes químicos do gênero *Cleome*

Embora tenha ocorrido uma junção de gêneros das famílias Brassicaceae e Capparaceae, existe ainda um baixo percentual de trabalhos fitoquímicos relacionados às espécies pertencentes a estas famílias. O gênero *Cleome* foi um dos poucos a ter sua constituição química investigada (ABEL-MOGIB, 1999). Dentre as classes de substâncias predominantes estão os terpenóides e os flavonóides.

No gênero *Cleome* destacam-se classes de metabólitos como os alcalóides (DELAVEAU et al., 1973); flavonóides (SHARAF et al., 1997; NASSAR; GAMAL-ELDEEN, 2003); fenoxicumarina (RAMACHANDRAN, 1979); diterpenos cembranos (COLLINS et al., 2004); cumarinas lignóides (ANIL et al., 1985); esteróides glicosilados; triterpenos damaranos e sais de amônio quaternário (McLEAN et al., 1996; AHMED et al., 2001). No estudo de Collins e colaboradores (2004) foram isolados diversos diterpenos do tipo cembrano da espécie *Cleome spinosa*, conforme mostrado na **Figura 3**.

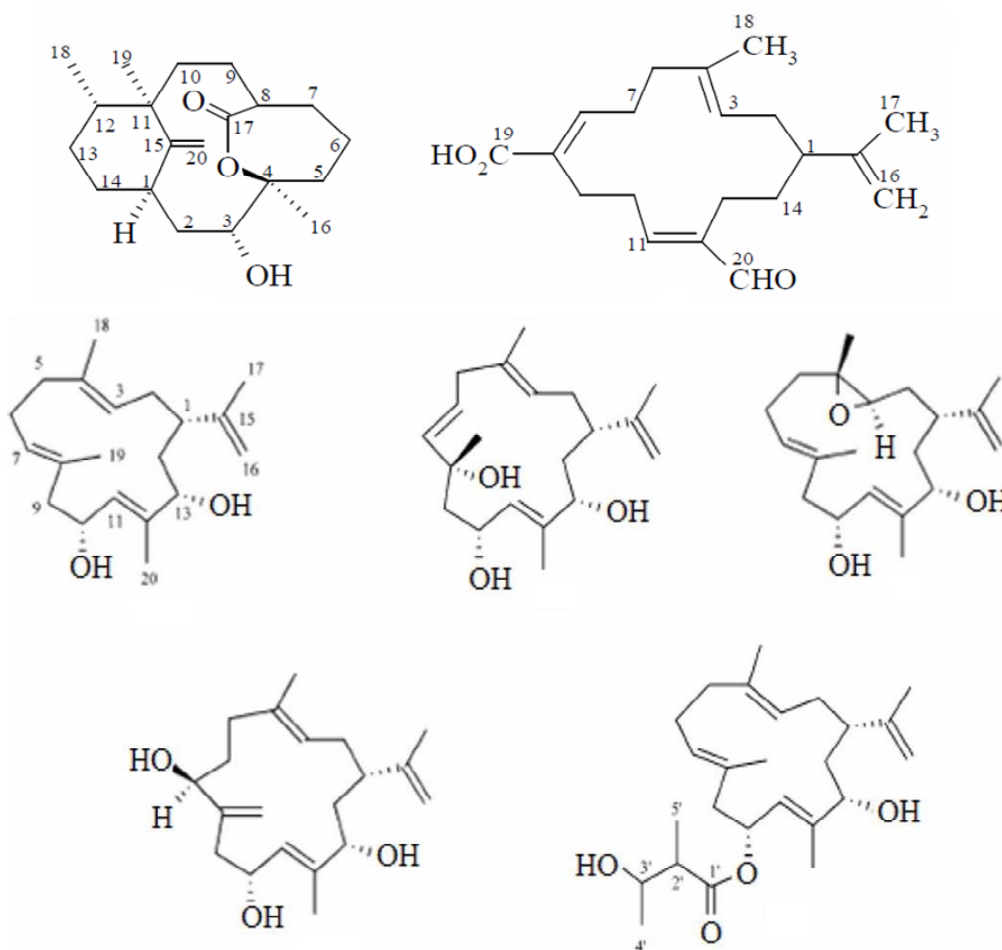


Figura 3. Diterpenos cembranos isolados da espécie *Cleome spinosa* Jack (COLLINS et al., 2004).

O estudo de quatro espécies de *Cleome* (*C. amblycarpa* Hassk, *C. brachycarpa* Vahl ex DC, *C. chrysantha* Decne e *C. droserifolia* Forssk) levou ao isolamento de onze flavonóides na forma de agliconas e quatorze flavonóides glicosilados (SHARAF et al., 1997). O levantamento de *C. spinosa* (1950-2008) revelou apenas um estudo fitoquímico com isolamento de diterpenos cembranos e flavonóides (COLLINS et al., 2004). Mais recentemente, Leal (2008) isolou diterpenos, flavonóides, catequinas, chalconas e alcalóides de seus extratos. Este mesmo autor verificou atividade anti-oxidante positiva para o extrato hidro-alcoólico da *C. spinosa*.

2.3 Flavonóides

Os flavonóides são caracterizados estruturalmente como difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$) que ocorrem naturalmente nos vegetais (BRAVO, 1998), sendo um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. São encontrados em frutas, e em diferentes partes dos vegetais, como nas sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (NIJVELDT et al., 2001). Mais de 4000 diferentes flavonóides já foram descritos (HOLLMAN; BATAN, 1997), sendo classificados como: flavonóis, flavonas, catequinas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (FORMICA; REGELSON, 1995).

A função dos flavonóides nas espécies vegetais tem sido relacionada à proteção da planta, principalmente à luz ultravioleta B (UV-B), atividade antimicrobiana e proteção contra alguns tipos de insetos. Desta forma, os flavonóides atuam como filtros de ultravioleta (UV), protegendo os tecidos fotossintetizantes. As isoflavonas, flavanas e flavonas são conhecidas por possuírem atividade antifúngica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os flavonóides possuem uma ampla variedade de efeitos biológicos em sistemas celulares de mamíferos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Dentre estas atividades estão a antimicrobiana, antiviral, anti-ulcerogênica, citotóxica, antineoplásica, mutagênica, anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-hepatotóxica, anti-hipertensiva, hipolipidêmica e antiplaquetária (FORMICA; REGELSON, 1995), o que lhes confere significativa importância farmacológica.

Em relação à atividade anti-inflamatória, estudos demonstram que os flavonóides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral alfa - TNF- α e interleucina 1 - IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido aracônico, tais como fosfolipase A₂ (PLA₂), ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; KIM et al., 2004; BIESALSKI, 2007; CAZAROLLI et al., 2008; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008).

Diversos métodos são utilizados na triagem da ação anti-inflamatória de compostos flavonóides. Os ensaios *in vitro* podem ser realizados em cultura de células e objetivam verificar se o flavonóide é capaz de reduzir ou até mesmo inibir a formação de mediadores, a produção de enzimas e citocinas envolvidas, a proliferação de linfócitos, dentre outros. Na regulação da síntese de prostaglandinas, a ciclooxigenase é uma enzima que representa um ponto crítico de controle (NARABA et al., 1998), sendo o principal alvo de ação das drogas anti-inflamatórias não esteroidais. Alguns flavonóides, como a quercitina, bloqueiam ambas as vias da ciclooxigenase e lipoxigenase em concentrações relativamente altas, enquanto que em baixas concentrações a via da lipoxigenase torna-se alvo primário de sua atividade anti-inflamatória (LANDOLFI et al., 1984).

Os ensaios *in vivo* utilizam agentes indutores de inflamação em animais de laboratório como, por exemplo, a carragenina, visando avaliar se o flavonóide é capaz de reduzir ou até mesmo de inibir a formação do edema, a migração das células de defesa, a formação de mediadores e enzimas, dentre outros (COUTINHO et al., 2009).

Estes compostos já foram investigados em modelos de inflamação *in vivo* em ratos, sendo observada significativa atividade nas fases proliferativa e exsudativa da inflamação (HANDA et al., 1992), como por exemplo na demonstração da inibição do edema de pata e do edema provocado pelo óleo de cróton no estudo de Di Carlo e colaboradores (1999). Em 2001, Guardia e colaboradores observaram que, após a indução experimental da artrite em ratos, flavonóides como a quercitina, rutina e hesperidina possuem habilidade em inibir a inflamação aguda crônica que ocorre nesta condição patológica.

Além disto, vários estudos demonstram a atividade anti-oxidante exercida pelos flavonóides, principalmente a capacidade de sequestrar várias espécies oxidantes, tais como ânion superóxido, radical hidroxila e radical peroxila (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Dentre os 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 foram derivados ou baseados em polifenóis de origem natural (YOON; BAEK, 2005). Os gêneros *Cleome* e *Capparis* são os mais representativos pela ampla ocorrência desta classe de metabólitos secundários (LEAL, 2008).

Os flavonóides investigados no presente trabalho foram avaliados em estudos anteriores, sendo encontradas diversas atividades. O flavonóide F₁₁₋₁₃, uma flavanona, apresentou as seguintes atividades biológicas: anti-espasmódica (WEIMANN et al., 2002),

antimutagênica (MIYAZAWA et al., 2003), antifúngica (LAGO et al., 2007) e bactericida (WANG et al., 1992). Já o F₁₀₋₁₆ apresentou reduzida atividade anti-oxidante; porém, análogos mais hidroxilados apresentaram maior atividade anti-oxidante, bem como atividade antimicrobiana (WANG et al., 1992).

2.4 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um fenômeno patológico conhecido e estudado desde os tempos antigos, sendo definida como uma “reação dos tecidos a um irritante”. Os sinais clínicos que caracterizam a inflamação, definidos por Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) são: “*rubor et tumor cum calore et dolore*”, expressão que traduzida significa: “rubor e tumefação, acompanhados de calor e dor”. Estes sinais e sintomas são conhecidos como os sinais cardeais da inflamação (JONES et al., 2000).

Durante séculos a inflamação foi reconhecida através destes sinais (KUSHNER, 1998), que são garantidos por componentes celulares e vasculares (**Figura 4**) que ocorrem no tecido lesionado. Em nível tecidual, o termo inflamação refere-se à dilatação vascular, alterações na permeabilidade capilar com aumento da exsudação de fluidos e proteínas para o sítio inflamatório, acúmulo de células de defesa e aparecimento de tecido de granulação em algumas circunstâncias.

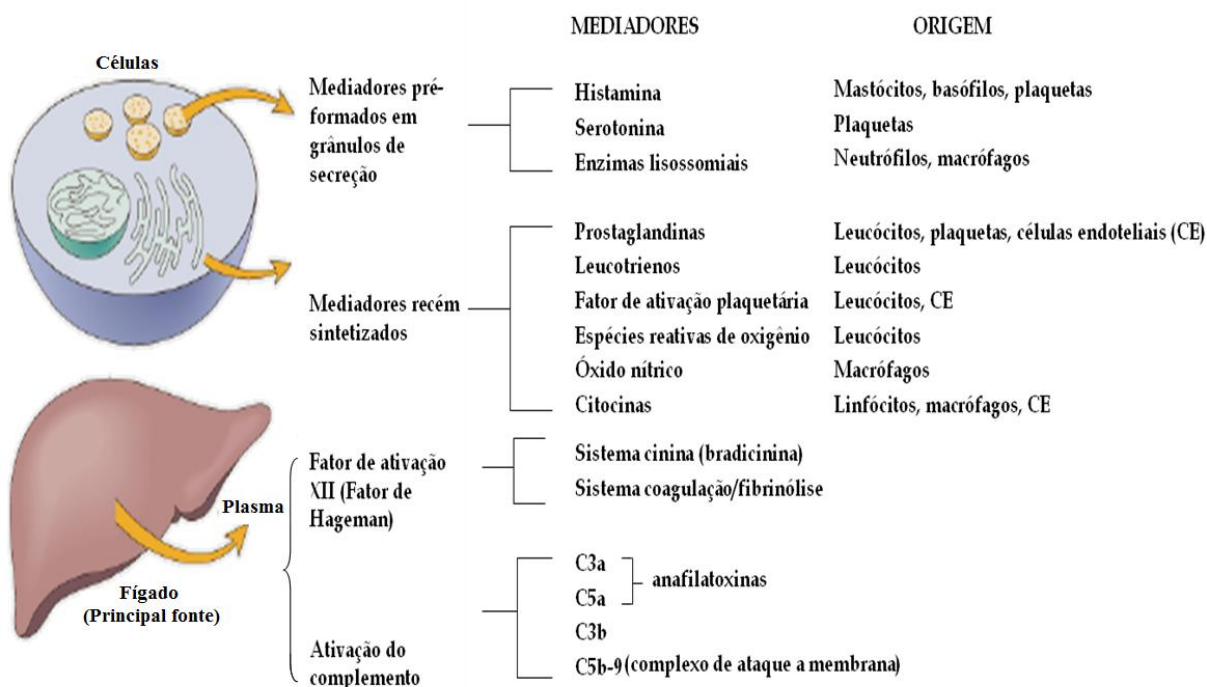


Figura 4. Principais mediadores liberados por fatores celulares e plasmáticos durante o processo inflamatório (adaptado de KUMAR et al., 2010).

O rubor é causado por um grande aumento do influxo sanguíneo no local inflamado. A tumefação provém não só deste evento mas também da presença de substâncias que extravasam dos vasos sanguíneos para os tecidos circunjacentes. O calor também é decorrente do aumento da circulação sanguínea, que transporta o calor existente nas temperaturas mais elevadas das partes internas do organismo até a periferia do corpo. Atribui-se a dor a um aumento de pressão nas terminações nervosas, mas pode-se incluir ainda como fatores determinantes da percepção da dor os efeitos irritantes dos produtos tóxicos e de mediadores sintetizados no processo inflamatório (JONES et al., 2000). A perda

da função foi incluída por Galeno como o quinto sinal cardinal da inflamação, durante o segundo século depois de Cristo (RATHER, 1971). A inibição reflexa dos movimentos musculares, iniciada pela dor, a tumefação mecânica e a destruição do tecido são eventos que contribuem para a perda da função (JONES et al., 2000).

Com a introdução da microscopia óptica, a inflamação começou a ser definida também em termos histológicos, particularmente no que tange à infiltração de células inflamatórias. Atualmente, pode-se observar através de métodos moleculares a expressão da inflamação associada à citocinas, genes inflamatórios, e à transcrição de fatores associados à inflamação propriamente dita (KUSHNER, 1998).

2.4.1 Fisiopatologia da inflamação

O processo inflamatório é caracterizado por um conjunto de alterações bioquímicas e celulares, através das quais o organismo tenta se defender de agentes agressores e reparar tecidos lesados. É, portanto, inicialmente, um processo fisiológico e desejável (LAWRENCE et al., 2002). Entretanto, apesar de extremamente necessário, esse processo poderá em determinadas situações se exacerbar, levando a efeitos deletérios (GILMAN et al., 2011).

Pode-se dividir a inflamação em três fases distintas, cada uma resultante de mecanismos diferentes: uma fase aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular; uma segunda fase, subcrônica, caracterizada por infiltração leucocitária e de células do sistema fagocitário mononuclear; e uma terceira fase, crônica proliferativa, onde ocorre lesão permanente, com substituição de células funcionais por células fibrosas, afuncionais (ROTELLI et al., 2003). Todos os mecanismos decorrentes do início do processo inflamatório ocorrem a partir de eventos originados nos vasos sanguíneos, seja induzindo sua dilatação e/ou permitindo a migração de células a partir de seu endotélio.

Os eventos vasculares iniciais incluem a dilatação das pequenas arteríolas, resultando em aumento do fluxo sanguíneo. Este processo é seguido por uma redução do fluxo e eventualmente estase do sangue, e um aumento na permeabilidade das vênulas pós-capilares com exsudação de líquido. A vasodilatação ocorre a partir da liberação de mediadores como a histamina, prostaglandina (PGE) e prostaciclina (PGI), produzidas através da interação de agentes agressores com o tecido em questão. Alguns destes mediadores atuam juntamente com as citocinas promovendo o aumento da permeabilidade vascular (RANG et al., 2007).

Existem quatro fatores derivados do plasma que se inter-relacionam para mediar muitos dos efeitos da inflamação, sendo todos envolvidos com cascatas enzimáticas proteolíticas: o sistema complemento, o sistema da coagulação, o sistema fibrinolítico e a cascata das cininas. A ativação da cascata do complemento, que é constituído por nove componentes enumerados de 1 a 9 (C1 a C9), é iniciada por substâncias derivadas dos microorganismos, como paredes celulares de leveduras ou endotoxinas. Assim como nas demais cascatas, existem proteases inativas que são ativadas por diversas clivagens proteolíticas, onde cada componente é ativado para ativar o componente seguinte. Desta forma, o complemento pode mediar a destruição de microorganismos invasores, o que, algumas vezes, pode provocar lesões no próprio hospedeiro. As principais enzimas das cascatas da coagulação e fibrinolítica, a trombina e a plasmina, podem também ativar a cascata do complemento, assim como enzimas liberadas pelos leucócitos. O sistema das cininas constitui outra cascata extremamente relevante para o processo inflamatório, produzindo diversos mediadores importantes como a bradicinina (RANG et al., 2007).

Os eventos celulares da inflamação envolvem a participação de diversos tipos celulares. Algumas destas células estão presentes normalmente nos tecidos (células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos) e outras (plaquetas e leucócitos) têm acesso a

partir do sangue. Os leucócitos são células ativamente móveis, sendo divididos em duas classes: polimorfonucleares e mononucleares. Os polimorfonucleares são os primeiros leucócitos sanguíneos a alcançar a área inflamada, realizando o processo de transmigração leucocitária através do endotélio vascular (**Figura 5**). Neste evento, os leucócitos realizam primeiramente o rolamento ao longo do endotélio ativado, e então aderem e finalmente migram para fora do vaso sanguíneo em direção ao espaço extra-vascular. Este processo, denominado diapedese, é regulado pela ativação de diferentes famílias de moléculas de adesão (selectinas, moléculas de adesão intracelular e integrinas) no endotélio inflamado, interagindo com contraligantes correspondentes presentes nos neutrófilos e capturando-os para a margem endotelial e daí ao espaço extravascular. Esta atração dos neutrófilos em direção ao agente invasor é mediada por substâncias químicas denominadas quimiotaxinas (ou quimiocinas), que podem ser liberadas por microorganismos ou produzidas localmente por células como os macrófagos, como é o caso da IL-8. A partir deste evento, os neutrófilos são então capazes de englobar, matar e digerir microorganismos através de produtos tóxicos do oxigênio e de enzimas proteolíticas. Se um neutrófilo for inadequadamente ativado, estas substâncias podem danificar os tecidos do próprio hospedeiro (RANG et al., 2007).

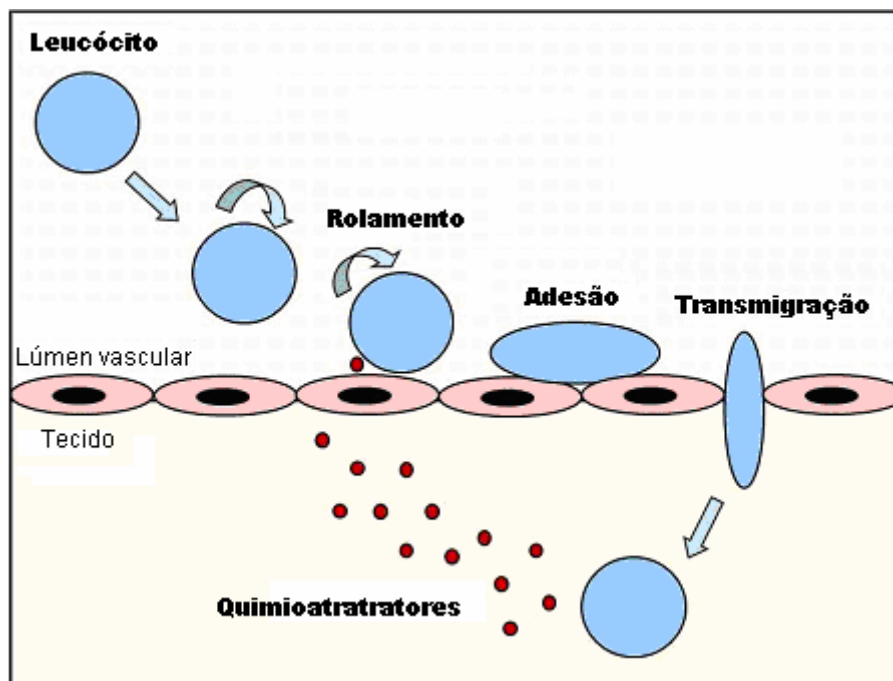


Figura 5. Transmigração leucocitária (KUMAR et al., 2010).

Os neutrófilos são células secretoras, e pela interação com uma ampla variedade de estímulos (mediadores produzidos pelas células residentes, componentes do antígeno ou o próprio antígeno) no foco inflamatório liberam agentes microbicidas e pró-inflamatórios. Dentro de segundos após a interação dos neutrófilos com seus estímulos agonistas, ocorre liberação de espécies reativas do oxigênio e produtos lipídicos. Logo depois, dentro de segundos a minutos, ocorre liberação de enzimas pré-formadas e proteínas que estavam armazenadas dentro de vesículas. Finalmente, a ativação da transcrição de genes resulta (dentro de poucas horas) na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias (BERTON; LOWELL, 1999).

2.4.2 O ácido aracdônico e as prostaglandinas

A enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) hidroliza os fosfolipídios de membrana celular iniciando a cascata do ácido aracdônico, acarretando um aumento na produção de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano A₂ e leucotrienos. Esta enzima pode ser ativada por diversos estímulos como químico, inflamatório, traumático e mitogênico. A inibição da fosfolipase A₂ pode ser considerada uma excelente atividade anti-inflamatória (CARVALHO et al., 1997).

O ácido aracdônico é um ácido graxo, inicialmente composto de 20 carbonos, que pode ser convertido pela enzima cicloxigenase nos compostos intermediários PGG₂ e PGH₂ (prostaglandinas G₂ e H₂ respectivamente) (KUMMER; COELHO, 2002) (**Figura 6**).

As prostaglandinas são membros de uma grande família de compostos endógenos, conhecidos como eicosanóides, e derivados de ácidos graxos e insaturados que apresentam 20 átomos de carbono (como o AA). Estas moléculas foram descobertas por dois ginecologistas americanos, Kurzok e Lieb, no início da década de 30, no sêmen humano. Em 1935, um pesquisador sueco, *von Euler*, observou que extratos de líquido seminal e de glândulas acessórias afetavam a pressão sanguínea e a função contrátil da musculatura lisa. Foram então denominadas prostaglandinas (PGEs), provavelmente por terem níveis elevados em extratos de próstata (SPINOSA et al., 2011).

Ao contrário de muitos autacóides, as prostaglandinas não estão armazenadas em vesículas ou outros compartimentos orgânicos; sua presença no organismo depende exclusivamente de sua síntese a partir de ácidos graxos disponíveis que, como os complexos fosfolipídicos, fazem parte de membranas celulares (SPINOSA et al., 2011).

Pela existência de inúmeros receptores específicos e vários mecanismos reguladores, explica-se a variedade clínica de atuação das prostaglandinas: papel central na inflamação, na coagulação sanguínea, na ovulação, no parto, no metabolismo ósseo, no crescimento e desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KUMMER; COELHO, 2002).

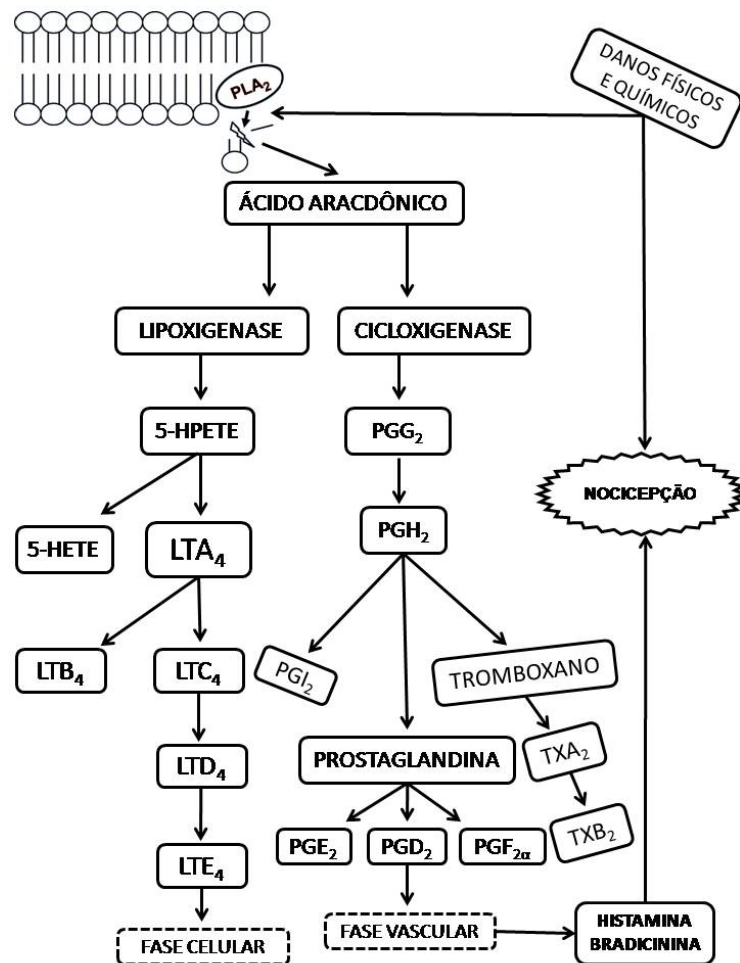


Figura 6. Cascata inflamatória a partir do ácido araquidônico (adaptado de SPINOSA et al., 2011).

As prostaglandinas desempenham papel importante como agentes pró-inflamatórios promovendo a dilatação das arteríolas, o que leva a um aumento do fluxo sanguíneo para a área de lesão e, embora sua capacidade de aumentar a permeabilidade capilar a proteínas plasmáticas por ação direta seja limitada, elas agem sinergicamente com outros mediadores, tais como a histamina e a bradicinina, que também aumentam a permeabilidade vascular. Em segundo lugar, as PGs, principalmente PGE₂, potencializam as ações de vários mediadores que induzem a dor, incluindo a bradicinina e a histamina, que são liberados nos locais da inflamação promovendo a estimulação dos nociceptores (LEES et al., 2004).

A potencialização do efeito algésico da bradicinina pela PGE₂ já foi demonstrada no estudo de Mense (1981), no qual foi observada a reposta de um neurônio aferente frente à estimulação com ambos os mediadores (**Figura 7**).

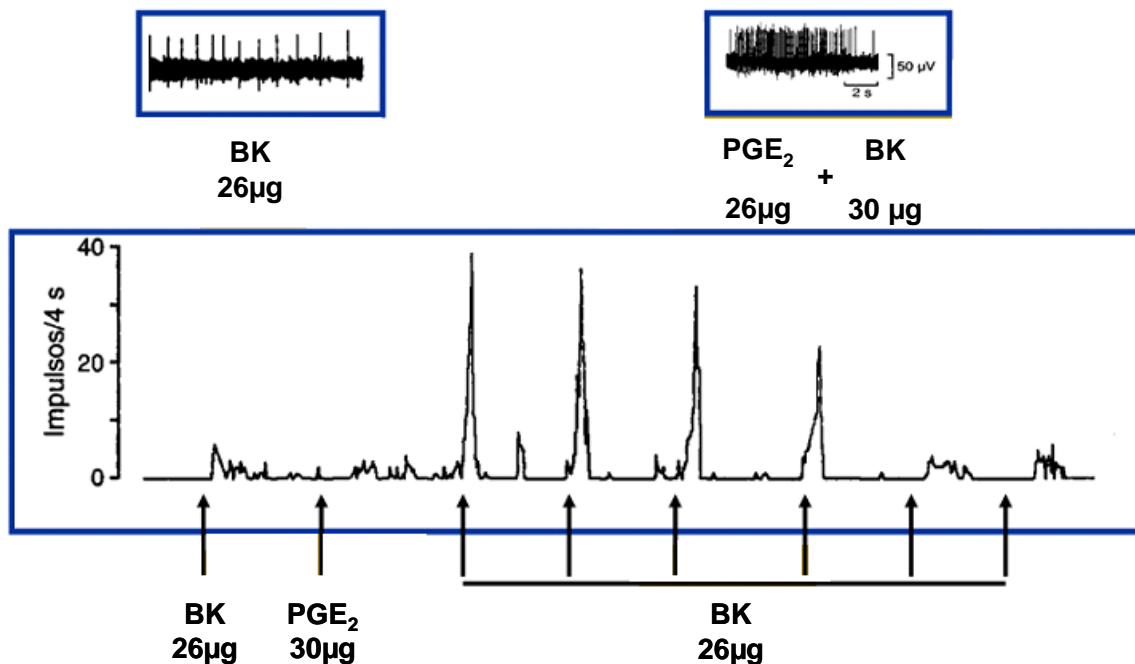


Figura 7. Efeito potencializador da prostaglandina E₂ (PGE₂) sobre a atividade algésica da bradicinina (BK) em um neurônio aferente (MENSE, 1981).

2.4.3 Citocinas e quimiocinas

Citocinas são pequenas moléculas protéicas produzidas por leucócitos e células estruturais, envolvidas na diferenciação das células imunocompetentes e na regulação dos mecanismos efetores das respostas imune e inflamatória. Uma mesma citocina pode ter várias ações em contextos biológicos diferentes, podendo atuar em sinergismo ou antagonismo com diversas outras citocinas. As quimiocinas são consideradas citocinas de um grupo particular, com propriedades químicas e funcionais específicas, importantes nos processos de quimiotaxia, capazes de estimular o movimento leucocitário e a quimiotaxia (KUMAR et al., 2010). Esses mediadores são fundamentais para desenvolvimento da dor e da inflamação.

A partir de um trauma tissular são liberadas uma série de citocinas, dentre as quais podemos destacar o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que induz a liberação de outras citocinas como a interleucina 1-Beta (IL-1 β) e a interleucina 8 (IL-8). A IL-1 β promove a ativação da enzima cicloxigenase (COX), a qual é responsável pela produção de prostaglandinas e tromboxanos (TXs). Por sua vez, a IL-8 promove a produção local de aminas simpatomiméticas, histamina e serotonina. O acúmulo local destes e outros mediadores químicos, bem como alterações na temperatura, pH tecidual, concentração de eletrólitos locais, como o K⁺, e a superexpressão (*upregulation*) de enzimas como cicloxigenase, protease e fosfolipase (BASBAUM; JULIUS, 2006; DRIESSEN, 2007), induzem a sensibilização de receptores sensitivos primários (NSP) provocando sensação de dor (**Figura 8**).

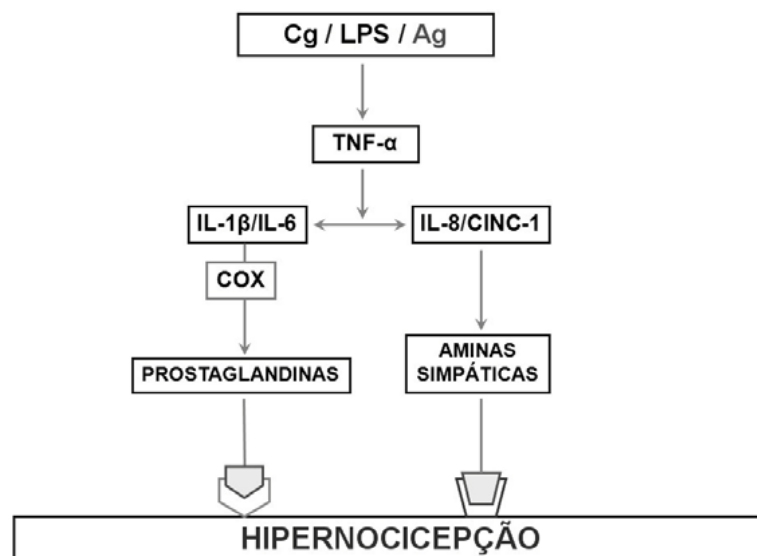


Figura 8. Liberação de mediadores inflamatórios por diferentes estímulos, como carragenina (Cg), lipopolissacarídeos (LPS) ou antígenos (Ag) (Adaptado de VERRI JR et al., 2006).

As primeiras citocinas descritas na fisiopatologia do processo inflamatório foram: IL-1 β , TNF- α , IL-6 e as quimiocinas IL-8, quimiocina quimioatraente de neutrófilos 1 (CINC-1) e quimiocina derivada dos queratinócitos (KC) (VERRI JR et al., 2006).

A IL-1 β é produzida principalmente por macrófagos, linfócitos e células da glia; está envolvida em muitas características do processo inflamatório, sendo responsável pela produção de outros mediadores deste processo. Esta citocina estimula o recrutamento de células da série branca sanguínea, auxilia na produção de febre (pirógeno endógeno), na liberação de proteínas de fase aguda e no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO et al., 1984; 1998). A IL-1 β estimula a expressão de cicloxigenase 2 (COX-2) e, como consequência, a formação e liberação de prostanóides que têm importante papel na sensibilização do nociceptor, atuando indiretamente como mediador hipernociceptivo (VERRI JR et al., 2006).

A IL-6 é uma citocina com várias células alvo e muitas atividades biológicas, estando envolvida principalmente na regulação das respostas inflamatória e imune. Estudos anteriores demonstraram que o anticorpo contra IL-6 inibe a hipernocicepção mecânica causada pelo TNF- α , em ratos (CUNHA et al., 1992).

Duas vias participam na hipernocicepção inflamatória envolvendo a formação final de prostanóides e de aminas simpatomiméticas, sendo a participação desses mediadores finais decorrentes dessas vias dependente do tipo de estímulo: enquanto a IL-1 β induz a liberação de prostanóides, a quimiocinas IL-8 medeia a participação do componente simpático. Os ratos não produzem IL-8, mas sim um análogo que é CINC-1/CXCL-1, ambos exercendo as mesmas funções, e o uso de soro anti IL-8 inibe a hipernocicepção causada pelo CINC-1/CXCL-1, e vice-versa (CUNHA et al., 1991; LORENZETTI, et al., 2002). Em camundongos, as quimiocinas produzidas são quimiocinas derivada dos queratinócitos (KC) e proteína inflamatória dos macrófagos 2 (MIP-2), relacionadas com IL-8 de humanos e a CINC-1/CXCL-1 de ratos (CUNHA et al., 2004).

2.4.3.1 TNF- α

O TNF- α é também uma potente citocina pró-inflamatória, que é produzida rapidamente e em grande quantidade, principalmente por macrófagos, após o estímulo inflamatório. Essa citocina interage com a célula alvo através de uma ligação de alta afinidade com os receptores TNFR1 (receptor de TNF, tipo 1) e TNFR2 (receptor de TNF, tipo 2). A ligação do mediador ao TNFR1 garante principalmente a migração de neutrófilos, o choque induzido por endotoxinas e a dor neuropática após lesão do nervo, enquanto que a ligação ao TNFR2 influencia a apoptose celular e necrose. O TNF- α induz hipernocicepção em ratos através de duas vias, independentes e paralelas, uma envolvendo o estímulo a produção de IL-1 β , com conseqüente liberação de prostanoídes e a outra através ativação da quimiocina CINC-1 (quimiocina de ratos, análoga a IL-8 em humanos), com conseqüente liberação de aminas simpatomiméticas. Desta forma, os prostanoídes e as aminas simpatomiméticas são os mediadores finais da hipernocicepção inflamatória (VERRI JR et al., 2006).

Sugere-se que o TNF- α e as IL-6 e IL-1 precedem, sequencialmente, a liberação de prostanoídes (VERRI JR et al., 2006). Os maiores indutores da biossíntese de IL-6 são TNF- α e IL-1 β (CHAI et al., 1996).

Em meados dos anos 80, a citocina TNF- α foi purificada, sequenciada e teve seu gene clonado. Desde então, várias propriedades atribuídas a esta citocina têm sido demonstradas (EIGLER et al., 1997). É uma citocina multifuncional que possui funções centrais na inflamação aguda e crônica, na resposta antitumoral e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). O TNF- α exerce um papel essencial na rede de citocinas, especialmente com relação à patogênese de muitas doenças infecciosas e inflamatórias (EIGLER et al., 1997). Dentre as inúmeras funções desta citocina, pode-se citar as seguintes descritas na **Figura 9**.

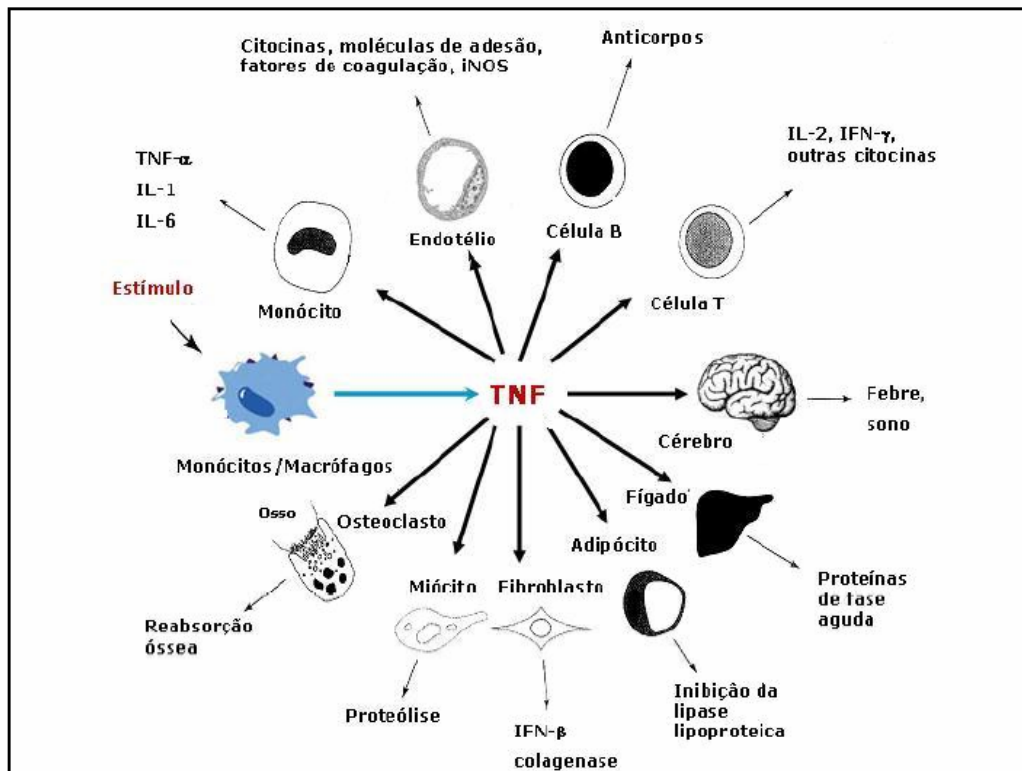


Figura 9. Atividades biológicas do TNF- α (EIGLER et al., 1997).

Devido à sua múltipla ação em diversos sistemas do organismo, o TNF- α possui tanto efeitos benéficos quanto maléficos, sendo responsável, por exemplo, pela destruição de células tumorais exercida pelos macrófagos e, em sinergismo com o interferon gama (IFN- γ), tem alto poder de destruição de tumores suscetíveis (ROITT et al., 1999).

Durante os últimos anos várias revisões tem sido descritas sobre a citocina TNF- α , principalmente sobre o seu papel nas doenças (DINARELLO et al., 1993; TRACEY; CERAMI, 1994; GIBSON et al., 2004; METHE et al., 2004; SCHACHNA, 2004). Em diversas doenças inflamatórias e infecciosas foram identificadas altas concentrações plasmáticas de TNF- α , como por exemplo na sepse, meningite bacteriana, malária cerebral, síndrome da angústia respiratória do adulto, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e artrite reumatóide (EIGLER et al., 1997).

Dentre as alterações promovidas pelo TNF- α podemos citar diversas mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais, incluindo a produção de outras citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a liberação de substâncias pró-coagulantes e a indução de iNOS. Essas alterações podem levar, dentre outros fatores, ao choque séptico. Além disto, o TNF- α estimula linfócitos T e B, induz a febre, estimula hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda e ainda suprime a lipase lipoprotéica, contribuindo assim para a caquexia (EIGLER et al., 1997).

A síntese de TNF- α é realizada principalmente por monócitos/macrófagos sob estímulo de diferentes substâncias exógenas como LPS e β -glucanas, ou por mediadores endógenos como a IL-1. A expressão de TNF- α também é dependente da ativação do fator de transcrição NF κ B (EIGLER et al., 1997). O NF κ B é um fator de transcrição que possui um papel crítico na expressão de mediadores inflamatórios. Está sequestrado no citosol formando um complexo com seu inibidor I κ B (FORMAN; TORRES, 2002). O NF κ B apresenta uma gama de ação maior quando comparado a outros fatores de transcrição já caracterizados, e isto ocorre devido à grande variedade de estímulos que o ativam, bem como a inúmeros genes e fenômenos que ele regula. Entre esses estímulos estão os neurotransmissores (como o glutamato), neurotrofinas, proteínas neurotóxicas (como a b-amilóide), citocinas (IL-1 e TNF- α), glicocorticóides, ésteres do forbol, peptídeo natriurético atrial, ceramidas, produtos provenientes de vírus e bactérias, radiação ultravioleta, produtos de reações de enzimas como a iNOS e a COX-2. Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento do cálcio intracelular para a ativação do NF κ B. Este fator de transcrição regula uma grande variedade de genes, que podem estar envolvidos em eventos como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular. Dentre estes genes, estão os envolvidos na produção de enzimas como a iNOS, a COX-2 e a SOD, e de citocinas como o TNF- α (GLEZER et al., 2000).

2.4.4 Cicloxigenase (COX)

A cicloxigenase (COX) é a enzima responsável pela síntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico (BOTTING, 2006; KVATERNICK et al., 2007). As prostaglandinas G₂ e H₂ são compostos intermediários e quimicamente instáveis e são convertidas pelas isomerases tissulares específicas em múltiplos prostanóides (PGD₂, PGE₂, PGF_{2 α} , PGI₂, TXA₂ e TXB₂). Entretanto, a maioria dos tecidos é capaz de converter PGH₂ em apenas alguns desses produtos finais, dependentemente do tipo de isomerase presente em cada tecido (HILÁRIO et al., 2006; FILHO; RAHAL, 2008; KING et al., 2009).

As PGs possuem grande diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, atuando no papel central na inflamação, coagulação sanguínea, angiogênese, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e no desenvolvimento neuronal, na cicatrização de feridas, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes

(KUMMER; COELHO, 2002; KVATERNICK et al., 2007). A prostaglandina ou prostaciclina I_2 é um composto instável, com meia-vida de três minutos, sendo convertida em um composto com menor atividade, a $PGF_{2\alpha}$ (BOTTING, 2006).

Nos últimos anos, tem se tornado claro que existem duas isoformas homólogas da COX, sendo referidas como COX-1 e COX-2 (JONES, 2001). Estas enzimas desempenham diferentes funções fisiológicas e, embora sejam muito semelhantes na estrutura protéica (sendo a COX-1 composta de 17 aminoácidos em sua cadeia peptídica amino-terminal, e a COX-2 de 18 aminoácidos na porção carboxi-terminal) essas enzimas são codificadas por genes diferentes. A COX-1 e a COX-2 têm aproximadamente 60% de homologia genética e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente. Por ter um sítio ativo mais largo que a COX-1, a COX-2 permite uma maior acessibilidade de drogas ao seu receptor (KVATERNICK et al., 2007).

Em quase todos os tecidos normais foi detectada a presença estrutural da COX-1 (DUBOIS et al., 1998), e baixos a não detectáveis níveis da COX-2, a qual pode ser expressa em maior quantidade mediante presença de citocinas, fatores de crescimento e estimulantes tumorais (FITZGERALD; PATRONO, 2001; HARRIS; BREYER, 2001), sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios. Desta forma, à COX-1 foi dado o nome de constitutiva e à COX-2, indutiva. Foi proposta ainda, a existência de uma terceira isoforma desta família enzimática, denominada COX-3, a qual, ao contrário da COX-1 e COX-2, não produziria prostanoídes pró-inflamatórios, mas sim substâncias anti-inflamatórias (WILLOUGHBY et al., 2000).

A COX-1 está presente em quase todos os tipos de células, exceto no eritrócito, sendo denominada constitutiva. Promove a síntese das PGs, principalmente as relacionadas com ações fisiológicas como proteção gástrica, agregação plaquetária, homeostase vascular e manutenção do fluxo sanguíneo renal. No trato gastrointestinal está associada à produção de muco protetor e inibição da secreção ácida gástrica, e nas plaquetas leva à síntese do tromboxano A_2 , um mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária. Assim, fármacos que inibem essa isoforma podem levar a diversos distúrbios no trato gastrointestinal, estando associadas ao risco de sangramento desta região como efeito adverso (KUMMER; COELHO, 2002; LEES et al., 2004; BRICKS; SILVA, 2005; FRANCO et al., 2006; HAZEWINKEL et al., 2008; STEAGALL et al., 2009).

A expressão da COX-2 ocorre após o estímulo inflamatório nas células migratórias e tecidos lesados, sendo assim chamada de indutiva. Esse estímulo está relacionado à presença de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, TNF- α , fatores de crescimento, endotoxinas e estimulantes tumorais, sugerindo sua relevância no câncer e em processos inflamatórios (KUMMER; COELHO, 2002; FRANCO et al., 2006; HAZEWINKEL et al., 2008).

A COX-2 também está relacionada às ações fisiológicas que mantêm a homeostase em tecidos como: útero, cartilagens, ossos, rins, ovário e endotélio vascular (KUMMER; COELHO, 2002; BRICKS; SILVA, 2005; HILÁRIO et al., 2006; PAPICH, 2008; STEAGALL et al., 2009). Também foi identificada no sistema nervoso central, sendo expressa de forma fisiológica no córtex, no hipocampo, no hipotálamo e no cordão espinhal. Esta isoforma auxilia no desenvolvimento das funções cerebrais normais da atividade sináptica (neurotransmissão) e na consolidação da memória (VANE et al., 1998; KUMMER; COELHO, 2002; SPINOSA et al., 2011). Já no tecido renal ela está presente na mácula densa e nas células intersticiais da medula renal, responsabilizando-se pela manutenção dos níveis de reabsorção de sódio e de água, devido à liberação de renina da macula densa. No sistema vascular assegura a produção de prostaciclina, que produz efeitos vasodilatadores e que evitam a agregação plaquetária, mantendo taxa de filtração glomerular e o fluxo sanguíneo renal (MATHEWS et al., 1990; KUMMER; COELHO, 2002; CLARK, 2006; SPINOSA et al., 2011).

2.5 DOR

A dor, definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como percepção de uma sensação nociceptiva desagradável (IASP, 2011), é parte integrante da vida, estando presente ao longo de todo o ciclo de desenvolvimento, desde o nascimento até a morte (TURK; MELZACK, 1992; WILLIAMS et al., 1993). Sendo um dos principais problemas em nossa sociedade, a dor tem representado um alto custo social devido ao elevado prejuízo ou ainda à incapacidade permanente de milhões de pessoas (VERRI et al., 2006).

A dor depende da percepção consciente da ativação do sistema sensorial nociceptivo e existe um relativo consenso de que, ao nascer, o sistema nociceptivo já está desenvolvido (LOWERY et al., 2007). É um fenômeno fisiológico, que produz respostas que servem para avisar e proteger o indivíduo, ajudando a manter a integridade corporal ou minimizando os danos (WOOLF; MANNION, 1999). Pode ser aguda ou crônica, e está relacionada a afecções traumáticas, infecciosas ou inflamatórias, havendo expectativa de desaparecimento após a cura da lesão.

A dor aguda apresenta um início súbito e, geralmente, não dura muito. Quando a dor é intensa, pode causar aceleração do ritmo cardíaco, aumento da frequência respiratória, elevação da pressão arterial, sudorese e dilatação pupilar (BEERS; BERKOW, 2001). Respostas como ansiedade e a agitação psicomotora também são frequentes (CARVALHO et al., 1999).

A dor crônica dura semanas ou meses. Geralmente refere-se à dor que persiste por mais de um mês além da evolução habitual de uma doença ou lesão, à dor que retorna e desaparece ao longo de meses ou anos ou à dor associada a uma doença de longa evolução, como por exemplo, em casos de câncer. Normalmente, a dor crônica não afeta o ritmo cardíaco, a frequência respiratória ou as pupilas (respostas neurovegetativas), mas pode alterar o sono (ansiedade), diminuir o apetite e causar constipação, perda de peso, diminuição da libido e depressão (BEERS; BERKOW, 2001).

Enquanto a dor por nocicepção, especialmente a aguda, é fundamental para a preservação da integridade do organismo, visto que é um sintoma que alerta para a ocorrência de lesões, a dor crônica não tem esse valor biológico e é uma importante causa de incapacidade (CARVALHO et al., 1999).

2.5.1 Fisiopatologia da dor

O primeiro passo na sequência dos eventos que originam o fenômeno sensitivo-doloroso é a transformação dos estímulos ambientais, físicos ou químicos intensos em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central (CARVALHO et al., 1999).

A dor de origem inflamatória resulta, basicamente, de interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Existem mediadores inflamatórios que apenas sensibilizam os nociceptores, e mediadores (e estímulos) que desencadeiam a resposta nociceptiva (HARDY et al., 1950). Mediadores como as citocinas e as quimiocinas pró-inflamatórias, são liberados pelas células locais ou migram para área inflamada, modulando a intensidade da resposta. O estímulo inflamatório, ou a lesão tecidual, irá promover a liberação de citocinas, que disparam a liberação dos mediadores finais, como prostanoídes e aminas simpatomiméticas, responsáveis pela resposta de dor (VERRI JR et al., 2006). Dessa forma, a dor periférica é iniciada pela endotelina, substância P, histamina e pela bradicinina, sendo ampliada pela ação das PGs, principalmente a PGE₂ e a PGI₂, através de sua ligação a receptores nociceptivos

(Figura 10). A PGI_2 está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE_2 se relaciona com a hiperalgesia longa, que pode persistir por até 6 horas (SPINOSA et al., 2011). O acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos como as aminas simpatomiméticas e a substância P (SP) atuam nos nociceptores sensitivos primários (NSP), induzindo a sua sensibilização. Já a hiperalgesia inflamatória é o resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos por uma ativação metabotrópica em todo neurônio sensitivo, ou seja, mudanças metabólicas nestas células neuronais facilitam a sua ativação (HARDY et al., 1950).

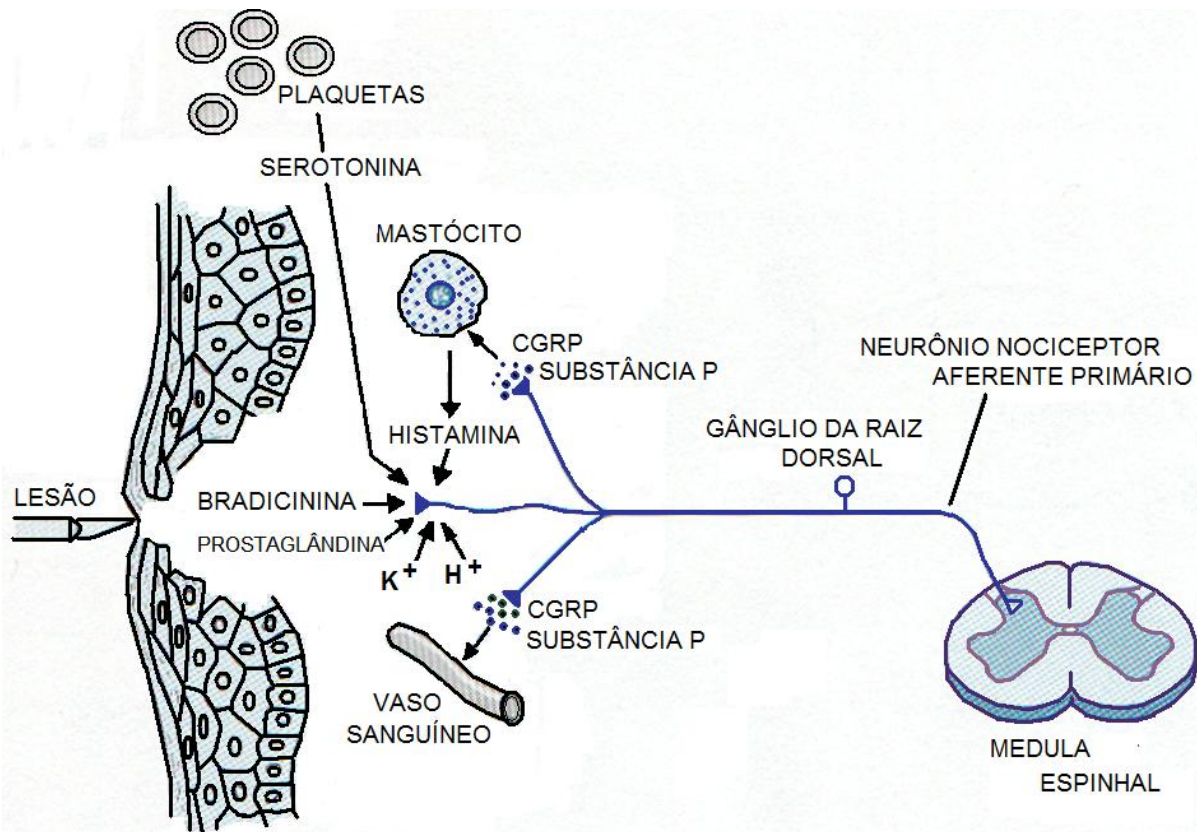


Figura 10. Lesão tissular e liberação de mediadores inflamatórios atuantes nos neurônios nociceptores aferentes primários (adaptado de NESTLER et al., 2001).

A sensibilização dos nociceptores sensitivos primários é transmitida para o corno dorsal da medula espinhal através da despolarização das fibras levemente mielinizadas, denominadas A delta ($A\delta$), ou não mielinizadas, chamadas fibras C, que são a via neuronal aferente primária (BESSON, 1999). Ambas as fibras estão diretamente relacionadas à inflamação, sendo capazes de transduzir impulsos provenientes de estímulos químicos, térmicos e mecânicos, em impulsos elétricos, que são transmitidos ao sistema nervoso central após a sua sensibilização. Por serem mielinizadas, as fibras $A\delta$ permitem uma rápida transmissão de estímulos (cerca de 12 a 30 m/s) que perduram por um curto período (RANG et al., 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001). Estes estímulos são de natureza térmica ou mecânica de alto limiar, sendo responsáveis pela dor pungente, localizada (DRIESSEN, 2007; FARQUHAR-SMITH, 2007). As fibras C, não mielinizadas, transmitem seus impulsos mais lentamente (cerca de 0,5 a 2 m/s) por um período mais longo. São consideradas fibras polimodais, isto é, são responsivas tanto a estímulos térmicos e mecânicos de alto limiar quanto a estímulos químicos. Estão associadas com a dor prolongada, difusa, em queimação (DRIESSEN, 2007; FARQUHAR-SMITH, 2007).

Além destas fibras, tem sido dada grande atenção a um grupo de fibras C denominadas nociceptores silenciosos, que seriam “acordados” durante o processo inflamatório, passando a participar da condução da dor inflamatória (SCHAIBLE; SCHMIDT, 1988; McMAHON; KOLTZENBURG, 1990).

Esses sinais periféricos provocam a liberação de neurotransmissores de ação rápida, como ATP e glutamato, bem como neuropeptídeos de ação lenta, como SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), neurotensina e neurocinina. Eles transmitem a informação periférica às fibras aferentes secundárias, que funcionam como transmissores (DRIESSEN, 2007). A comunicação com os neurônios secundários (ou de segunda origem) ocorre em regiões medulares conhecidas como lâminas de Rexed (REXED, 1952; WALL, 1967; DUBNER; BENNETT, 1983; BESSON; CHAOUCH, 1987; WILLIS; COGGESHALL, 1991). Além disto, dependendo do tipo de neurônio (A δ ou C) há uma localização terminal diferenciada na medula espinhal. A maioria dos neurônios associados à inflamação termina nas lâminas mais superficiais (camada I e II – substância gelatinosa).

Já em camadas mais profundas, chegam fibras de grosso calibre e envolvidas por grande quantidade de mielina, conduzindo a informação a altas velocidades (cerca de 30 a 70 m/s), e são especializadas em detectar estímulos de baixa intensidade, sendo importante para a manutenção da integridade do indivíduo. Estas fibras, conhecidas como fibras A β (**Figura 11**), também podem detectar estímulos nociceptivos; e a informação que chega a essas camadas é transmitida para os centros superiores de processamento por neurônios secundários conhecidos como neurônios de ampla faixa dinâmica (WDR – wide dynamic range neurons), os quais são capazes de conduzir informações geradas por estímulos de diferentes naturezas (DUBNER et al., 1989; BONICA, 1990; MILLAN, 1999).

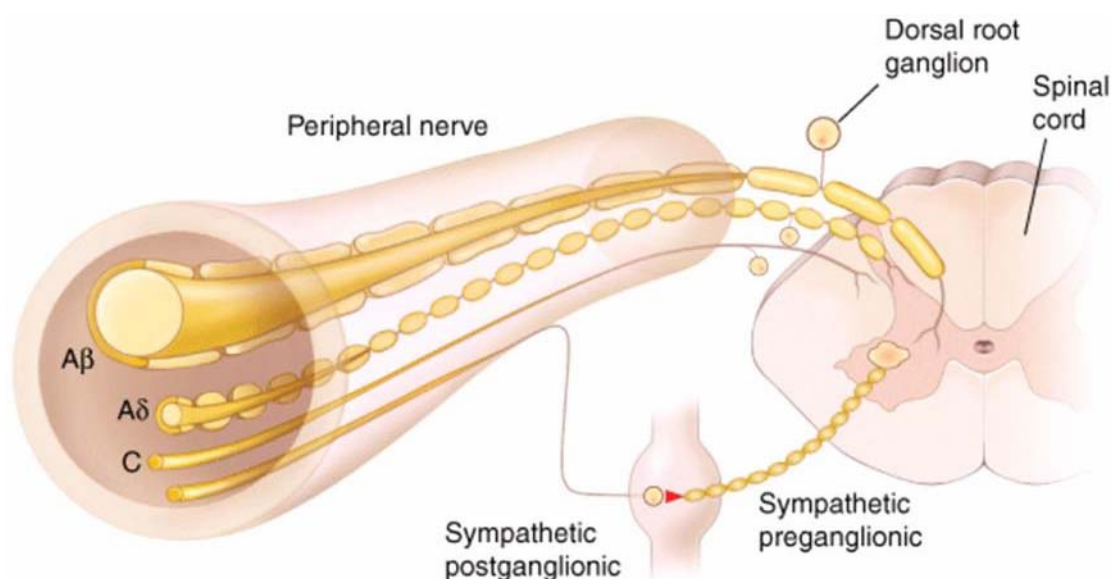


Figura 11. Correlação entre calibre das fibras nociceptivas e aferência à região medular (FAUCI et al., 2001).

Prosseguindo, as fibras secundárias ascendem e estimulam áreas como tálamo e córtex sensorial, bem como formação reticular, sistema límbico e hipocampo, as quais estão relacionadas com experiências de memória, cognição e emoção, que contribuem para a percepção global da experiência dolorosa (FARQUHAR-SMITH, 2007).

2.5.2 Dor incisional

A dor incisional pós-operatória é uma forma particular de dor aguda. Devido à diminuição da morbidade alcançada com métodos de analgesia pós-operatória, novos tratamentos são constantemente investigados (KALSO; ROSENBERG, 1995). Existem inúmeras evidências de que a dor causada por inflamação, injúrias a estruturas nervosas e incisões é baseada em diferentes mecanismos fisiopatológicos (HONORE et al., 2000; HUNT; MANTYH, 2001). Isto explica o motivo pelo qual muitas estratégias de tratamento são eficazes apenas contra tipos específicos de dor persistente (HONORE et al., 2000). Alguns termos muito aplicados na definição de condições dolorosas incluem: *alodinia*, que é a dor provocada por um estímulo normalmente não doloroso; *hiperalgesia*, que é uma resposta aumentada a um estímulo normalmente doloroso; *disestesia*, que é uma sensação desagradável anormal, seja espontânea ou evocada. Logo, a alodinia e a hiperalgesia são dois tipos de disestesia (WOOLF; MANNION, 1999; FARQUHAR-SMITH, 2007). Existe uma diferença entre os termos nociceção e dor. O termo nociceção refere-se a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos, e por este motivo seria mais apropriado para descrever a intensidade de dor avaliada em modelos experimentais em animais. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial, envolvendo para isto componentes emocionais (MELZACK; LOESER, 1999; ALMEIDA et al., 2004).

Em 1999, Woolf e Mannion relataram que a hiperalgesia e a alodinia podem ser decorrentes de uma sensibilização central, quando há resposta aumentada dos neurônios que conduzem o estímulo doloroso na medula espinhal, bem como de uma sensibilização periférica, que decorre da diminuição do limiar de ativação do nociceptor, como na exposição a produtos de dano tecidual ou mediadores pró-inflamatórios. Atualmente, o termo “alodinia” pode ser substituído por “alodinia tátil dinâmica” (MERSKEY, 2005), que corresponde a um sinal clínico mediado por ativação periférica de receptores táteis, que ganham acesso ao processamento nociceptivo central (TREEDE et al., 2004).

A alodinia é uma característica das neuropatias, nas quais ocorrem lesões neuronais, fazendo com que estímulos de pouca intensidade e pequena duração passem a causar dores lancinantes ou sensações de queimação contínua, ou ainda ocorrência de dores espontâneas intensas sem qualquer estímulo. Portanto, a sensibilização neuronal que ocorre durante a inflamação pode ser traduzida como hipernociceção inflamatória, ou simplesmente hipernociceção, quando existir sintoma paralelo no homem (FERREIRA et al., 2010).

Os mediadores inflamatórios liberados durante a resposta imune inata podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores hiperalgésicos finais. Os primeiros são liberados no início e durante a inflamação, sendo responsáveis pela liberação de outros mediadores intermediários. Por outro lado, os mediadores hiperalgésicos finais interagem com seus receptores específicos nos neurônios aferentes primários promovendo modificações moleculares responsáveis por sua sensibilização. Dentre eles estão as prostaglandinas e as aminas simpáticas, que atuam em receptores presentes na membrana dos neurônios nociceptivos, e sua ativação estimulará vias de sinalização intracelular levando ao desenvolvimento da sensibilização neuronal (FERREIRA; NAKAMURA, 1979; TAIWO et al., 1989; ALEY; LEVINE, 1999; ALEY et al., 2000).

No fenômeno da hiperalgesia inflamatória, a liberação dos mediadores respeita uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Por este motivo, ao bloquearmos um passo desta sequência com determinada substância pode-se inibir o desenvolvimento de determinados eventos, sinais e sintomas do processo inflamatório, inclusive a dor (**Figura 12**) (CUNHA et

al., 1992; FERREIRA et al., 1993; WATKINS et al., 1995; SACHS et al., 2002; LORENZETTI et al., 2002).

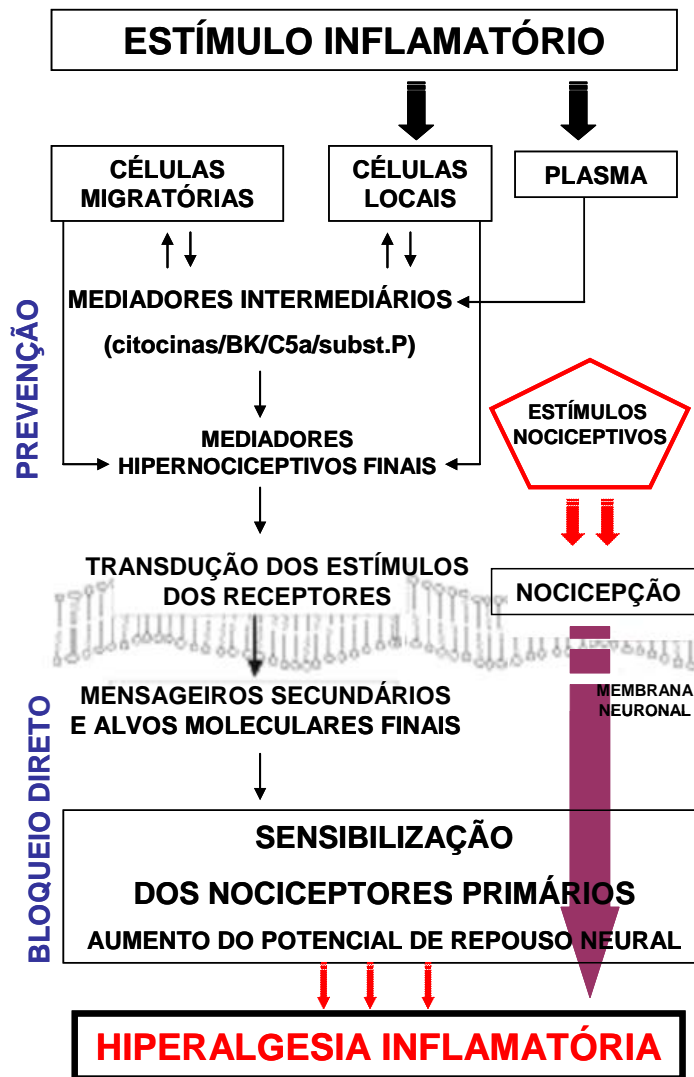


Figura 12. Hiperalgesia inflamatória (adaptado de FERREIRA et al., 2010).

Entre os mediadores intermediários podemos destacar as citocinas e quimiocinas como sendo os mediadores mais característicos da dor inflamatória, sendo de extrema importância para o fenômeno. Estes mediadores, que a princípio pareciam ser importantes apenas no recrutamento de leucócitos (mais especificamente neutrófilos) para o foco inflamatório, foram reconhecidos posteriormente como relevantes na gênese da sensibilização nociceptiva. As citocinas mais importantes quando se refere à hipernocicepção são: o TNF- α , a IL-1 e a IL-8 (CUNHA et al., 1992; WATKINS et al., 1995; FERREIRA et al., 1993; FERREIRA et al., 1988).

Após uma incisão cirúrgica podem ocorrer dois tipos de hiperalgesia: a primária e a secundária. A hiperalgesia primária é caracterizada pelo aumento da dor através de estímulos térmicos e mecânicos na área de incisão. Por outro lado, a hiperalgesia secundária ocorre quando há aumento da dor somente sob estímulo mecânico na área adjacente ao tecido incisado (RICHMOND et al., 1993; TVERSKOY et al., 1994).

Modelos clínicos de dor pós-operatória têm sido estudados extensivamente, e incluem o modelo de incisão na região plantar da pata traseira de ratos (BRENNAN et al., 1996). Este

modelo demonstra que, duas horas após a incisão plantar, há um aumento significativo da nocicepção dos animais. Posteriormente, os valores encontrados para representar a nocicepção pós-operatória começam a decair progressivamente a cada dia.

Pogatzki e colaboradores (2002), demonstraram que fibras A δ e C foram sensibilizadas através de uma incisão cirúrgica, caracterizando o papel da ativação de nociceptores mecânicos na manutenção da hiperalgesia pós-incisional. Após procedimentos cirúrgicos envolvendo a pele e estruturas mais profundas, ocorre percepção de dor mediante estímulos como toque e pressão, os quais usualmente não incitam esta resposta do organismo por serem estímulos inócuos (RICHMOND et al., 1993; MOINICHE et al., 1997). Estas respostas exageradas podem ser mensuradas utilizando-se um transdutor de pressão, como o *von Frey* eletrônico (MÖLLER et al., 1998).

No esquema a seguir (**Figuras 13A e 13B**) observa-se a mudança de resposta neuronal mediante um estímulo inócuo, antes e após uma incisão tecidual (ZAHN et al., 2002). Uma incisão cirúrgica causa ativação e sensibilização de neurônios periféricos e centrais. A aplicação de um estímulo mecânico inócuo (filamentos de *von Frey*) na pele íntegra (**A**) ativa exclusivamente mecanorreceptores mielinizados (fibras A β), produzindo um pequeno aumento nos potenciais de ação na dinâmica dos neurônios do corno dorsal medular (em vermelho). Neste caso, os nociceptores não são ativados.

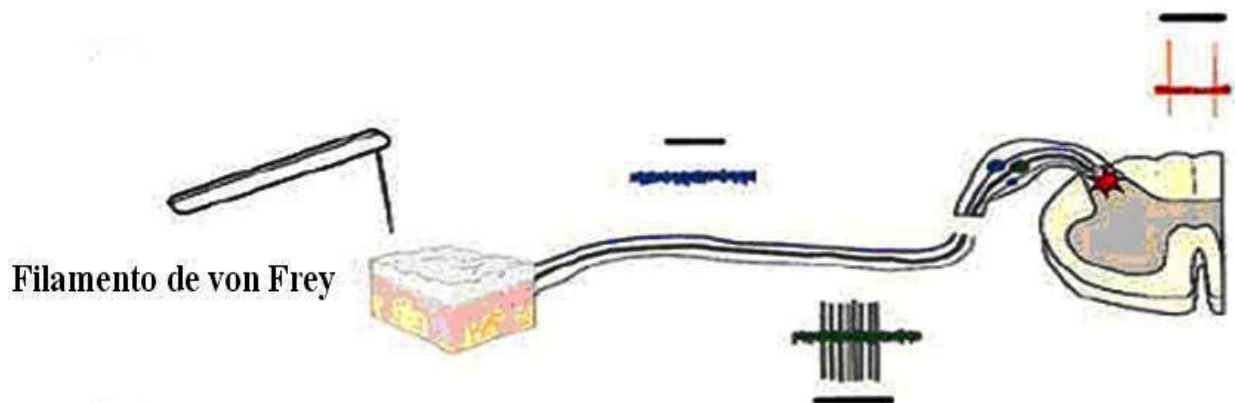


Figura 13A. Resposta neuronal mediante um estímulo inócuo (ZAHN et al., 2002).

Após a incisão (**B**) ocorre um aumento espontâneo na atividade de nociceptores (em azul), e o mesmo estímulo inócuo agora é capaz de ativar as fibras nociceptivas aferentes (em azul). Subsequentemente, este estímulo contínuo provoca um aumento da atividade dos neurônios do corno dorsal medular (em vermelho).

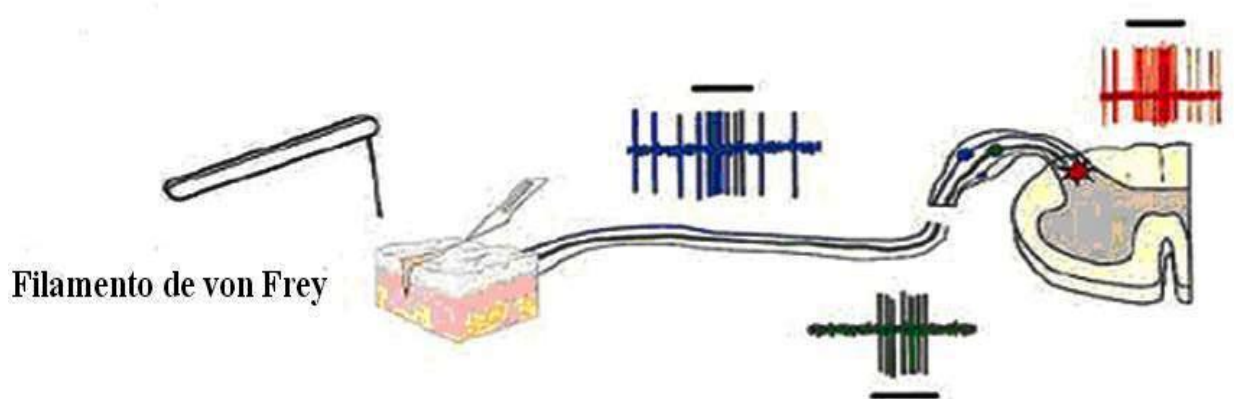


Figura 13B. Conversão de um estímulo inócuo para estímulo nociceptivo após uma incisão (ZAHN et al., 2002).

2.5.3 Mecanismos de modulação da dor

Apesar de haver desde o início deste século evidências da existência de mecanismos supressores da percepção da dor, foi com a apresentação da “teoria de comporta”, proposta por Melzack e Wall, em 1965, que os sistemas modulatórios passaram a ser conhecidos. Segundo esta teoria, a supressão da dor decorreria da inibição pré-sináptica na medula espinhal resultante da colisão entre potenciais dos aferentes primários e os antidrômicos originados na substância gelatinosa do CPME (substância cinzenta da medula espinhal). A ausência de correspondência anatômica, eletrofisiológica, neuroquímica e de achados clínicos que sustentassem a “teoria de comporta”, como originalmente idealizada, foram razões para que esta não fosse mais aceita tal como apresentada (CARVALHO et al., 1999).

Atualmente, sabe-se que os sinais dolorosos que chegam ao corno dorsal da medula ativam interneurônios inibitórios locais, os quais formam sinapses recíprocas com os neurônios aferentes primários e, em certos casos, com os neurônios ascendentes secundários, criando uma espécie de *feedback* inibitório (Figura 14). Essa modulação é conduzida por diversos mediadores, incluindo neuropeptídeos opióides, atuando primariamente em receptores μ e κ , neurotransmissores adrenérgicos, atuando em receptores α_2 , serotonina, GABA (ácido gama-aminobutírico), glicina e estrogênio (DRIESSEN, 2007).

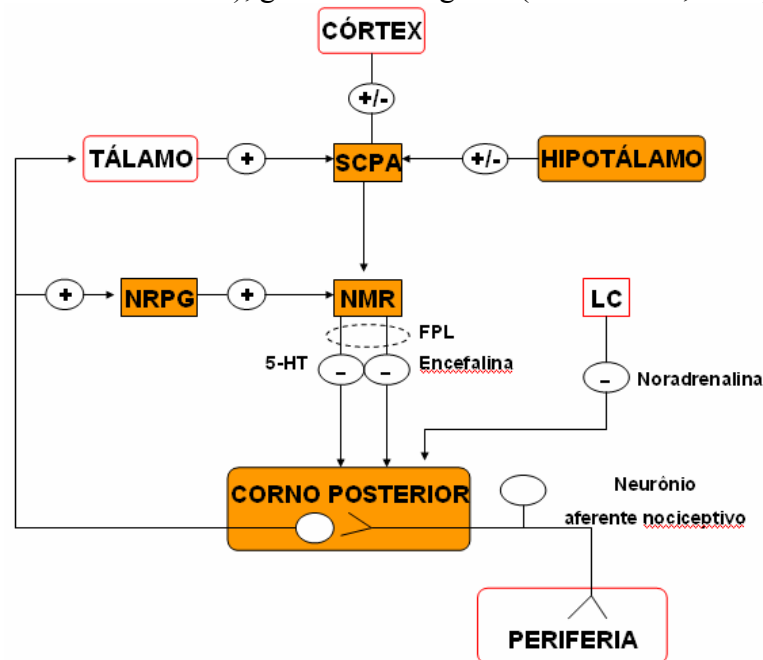


Figura 14. Sistema de controle descendente na transmissão dolorosa. SCPA= substância cinzenta periaquedutal; NRPG= núcleo reticular paragigantocelular; NMR= núcleo magno da rafe; 5-HT= 5-hidroxitriptamina; LC= *locus coeruleus*; FPL= funículo póstero-lateral (adaptado de RANG et al., 2007).

Esses mecanismos agem como reguladores do tipo “portão”, controlando o fluxo da informação nociceptiva até o cérebro. As influências inibitórias vêm pelos neurônios não-nociceptivos $A\alpha$ e $A\beta$, que são mais espessos e fortemente mielinizados, bem como dos supra-espinhais, os quais inibem uma família de neurônios chamados neurônios T (*trigger cells* ou gatilho), responsáveis pela percepção da dor. Os mesmos neurônios T podem ser também estimulados pelas fibras $A\delta$ e C, e a percepção ou não da dor vai depender de um balanço entre essas vias inibitórias e excitatórias (WOOLF; MANNION, 1999; CALVINO; GRILLO, 2006).

Existem ainda os peptídeos opióides, amplamente distribuídos no cérebro, bem como produzidos por células não neuronais, como glândulas endócrinas e exócrinas e as do sistema imune, que são potentes moléculas capazes de modular a dor. Os mais conhecidos são a β -endorfina, a metionina-encefalina, a leu-encefalina, a dinorfina e as endomorfina, que se ligam a receptores específicos (FOORD et al., 2005; BIE; PAN, 2007). A ativação dos receptores opióides está relacionada a três eventos intracelulares: inibição da enzima adenilatociclase, com conseqüente diminuição dos níveis de AMPc (AMP cíclico); bloqueio dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente e aumento do efluxo de K^+ , com conseqüente hiperpolarização da membrana. Dessa forma, há diminuição da excitabilidade de nociceptores periféricos, da propagação de potenciais de ação, da liberação de peptídeos pró-inflamatórios e da vasodilatação evocada pelo estímulo das fibras C. Todos esses fatores, em conjunto, resultam em analgesia e ação anti-inflamatória (STEIN et al., 2003).

3 OBJETIVOS

Utilizando metodologias farmacológicas *in vivo* e *in vitro*, o presente estudo tem como objetivos investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* (EMCS) e dos compostos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ isolados deste extrato, determinando possíveis mecanismos envolvidos com essas atividades.

Este trabalho tem como justificativa a fundamentação de algumas das utilizações populares da *Cleome spinosa*, através da investigação da atividade farmacológica de um de seus extratos (extrato metanólico) e dois de seus flavonóides. Além disto, a utilização de produtos naturais tem se tornado uma promissora fonte para a busca de novos compostos que venham a apresentar, dentre outras características, atividades analgésicas e anti-inflamatórias, podendo vir a diferenciar-se no mercado farmacêutico no que tange à redução de custos e de efeitos adversos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 35g, e ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando entre 250 e 300g, ambos adultos e fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Os animais foram mantidos sob iluminação controlada em um ciclo claro/escuro de 12/12h e com regime de água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986; PORTER, 1992). Para a execução dos experimentos padronizou-se o período mínimo de uma hora para adaptação dos animais ao laboratório. Após as avaliações experimentais os animais foram submetidos à eutanásia através da utilização de câmara de CO₂.

Esta metodologia foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética na Pesquisa, sob o protocolo nº3404/2011/COMEP, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

4.2 Material Botânico

As partes aéreas de *Cleome spinosa* foram coletadas em Pitangi (RN) e a identificação botânica desta espécie foi realizada pela botânica Maria das Dores Melo. A exsicata de *Cleome spinosa* Jacq (No. 00276) foi preparada e depositada no Herbário da Universidade Potiguar (Rio Grande do Norte) (HUNP).

4.3 Drogas, Reagentes e solventes

Extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* (material fornecido pela Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Medeiros Maciel, Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte), flavonóides isolados do extrato metanólico da *C. spinosa*, de mesma procedência do extrato: F₁₀₋₁₆ (5,4'-dihidroxi-3,7,3',-trimetoxiflavona) e F₁₁₋₁₃ da *Cleome spinosa* ((2S)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavanona); dexametasona (Decadron[®], Aché Lab. Farm., São Paulo, Brasil), água destilada, solução salina 0,9%, ácido acético 1,2%, indometacina e carragenina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA, morfina (Dimorf[®], Cristália, São Paulo - Brasil), formaldeído 3,0%, éter, solução de PBS, heparina, tween[®] 80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), solução de Türk, pentabiótico veterinário[®] (Fort Dodge Sacede Animal Ltda, São Paulo, Brasil), solução de iodo-povidona 10% tópico (Riodeíne[®], Laboratório Ind. Farm. Rioquímica Ltda, São Paulo, Brasil), cloridrato de ketamina (Dopalen[®], Sespo – Divisão Vetebrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (Anasedan[®], Sespo – Divisão Vetebrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

4.4 Obtenção do Extrato e dos Flavonóides (adaptado de LEAL, 2008)

As partes aéreas do material vegetal (2,7kg) foram dessecadas e trituradas, obtendo-se um pó. O material pulverizado foi submetido à percolação em MeOH/H₂O (7:3), obtendo-se o extrato metanólico (hidroalcoólico) com rendimento de 4,7% (126g).

O extrato metanólico da *Cleome spinosa* (EMCS) foi cromatografado em coluna filtrante de sílica gel (35-70 Mesh), tendo sido utilizado como eluente misturas de hexano:acetato de etila:metanol:água em gradiente de polaridade. Foram obtidas 25 frações (250mL cada) que foram reunidas através de comparações por cromatografia em camada delgada de sílica (CCF), obtendo-se 41 frações que posteriormente foram reunidas (após nova análise de CCF) fornecendo 10 grupos de frações designados de CS-EM-1 até CS-EM-10 (*Cleome spinosa* - Extrato Metanólico - grupo de fração correspondente).

Destes 10 grupos, destacam-se dois de importância para o presente estudo: CS-EM-3 e CS-EM-4. Ambos foram submetidos a novos fracionamentos cromatográficos (**Figura 15**), conduzindo ao isolamento, respectivamente, das substâncias CS-EM-3b e CS-EM-4a.

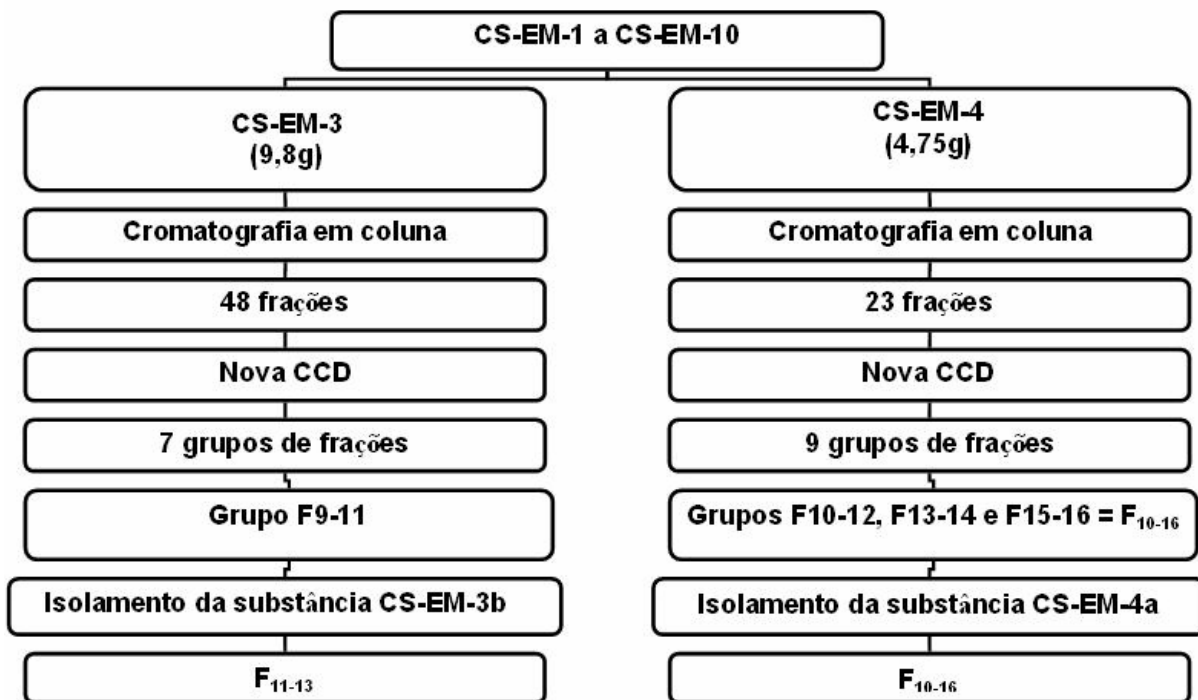


Figura 15. Fluxograma de obtenção dos grupos de frações do EMCS.

A substância CS-EM-3b teve sua estrutura molecular ($C_{17}H_{16}O_5$) estabelecida com base nos espectros de RMN (ressonância magnética nuclear) de 1H e de RMN de ^{13}C . Estes dados foram compatíveis com a estrutura de uma flavanona, recebendo então a seguinte nomenclatura: (2S)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavanona (**Figura 16**), sendo também denominado como F₁₁₋₁₃ (flavonóide 11-13). Seu peso molecular é de 300,10g/mol, e ponto de fusão de 363,49°C. O valor do coeficiente de partição lipídeo água para o F₁₁₋₁₃ é de 1,47. O rendimento desta substância em relação ao material vegetal total (2,7kg) foi de 0,0005%.

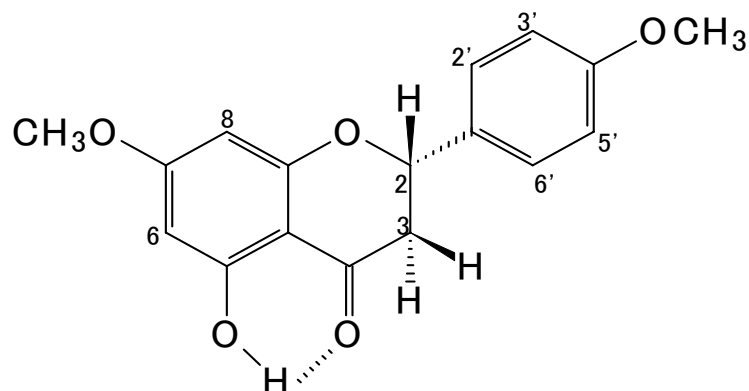


Figura 16. Flavonóide 11-13: (2S)-5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavanona (LEAL, 2008).

A substância CS-EM-4a mostrou absorções em RMN compatíveis com uma flavona, tendo sua estrutura estabelecida com base nos espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C . Desta forma, foi possível propor a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ nomeada de 5,4'-diidroxiflavona (Figura 17), sendo também denominada como --F₁₀₋₁₆ (flavonóide 10-16). Seu peso molecular é de 346,11g/mol, e ponto de fusão de 504,47°C. O valor do coeficiente de partição lipídeo água para o F₁₀₋₁₆ é de 2,16. Seu rendimento em relação ao material vegetal total foi de 0,001%.

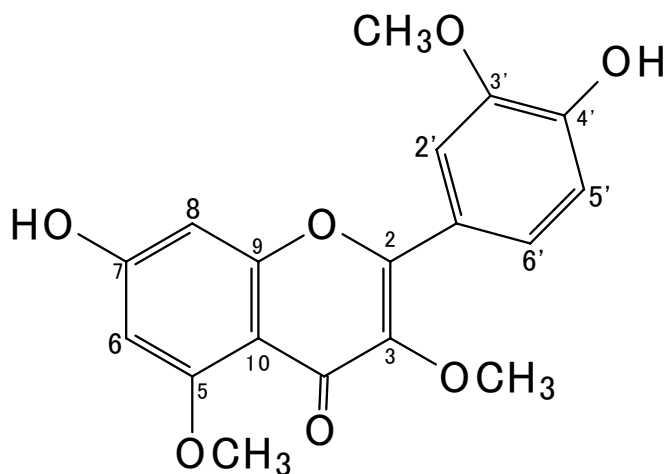


Figura 17. Flavonóide 10-16: 5,4'-diidroxiflavona (LEAL, 2008).

4.5 Métodos Farmacológicos

4.5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.5.1.1 Teste da formalina

Grupos de camundongos (n=10) foram tratados pela via oral com o veículo (água; 10mL/kg), com o EMCS (1g/kg), com o F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg), ou com os controles positivos indometacina ou morfina (ambos na dose de 10mg/kg). Uma hora após os tratamentos, foi injetado pela via intraplantar (*i.pl.*) 20μL de solução de formalina a 3,0% v/v (formaldeído 1,2% v/v) no membro posterior direito de todos os animais.

Após a injeção intraplantar de formalina, os animais são colocados em caixas de acrílico espelhadas a fim de facilitar a visualização do comportamento de lambar, morder ou sacudir a pata (DUBUISSON; DENNIS, 1977), sendo avaliado o tempo de reação à dor (em segundos) nos dois períodos de nocicepção referentes a dor de origem neurogênica (0-5 minutos) e de origem inflamatória (15-30 minutos) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), em segundos, do tempo de reação ao estímulo flogístico.

4.5.1.2 Modelo de dor Incisional - Delineamento experimental

Neste ensaio experimental foram utilizados ratos, os quais foram divididos em três grupos de oito animais em média, de maneira randomizada, sendo um grupo utilizado para a avaliação farmacológica (EMCS; 1g/kg), e dois grupos de animais controle tratados com veículo (água; 10mL/kg), onde apenas um dos grupos controle foi submetido ao procedimento cirúrgico incisional.

A cirurgia foi realizada conforme descrito por Brennan e colaboradores (1996). Os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg), administrados por via intraperitoneal. Em todos os animais, foi administrada no pré-operatório uma dose de 0,5 mL/kg de pentabiótico veterinário, por via intramuscular seguido de procedimentos de antissepsia, que consistiram na preparação da região plantar do membro posterior direito, com iodo-povidona 10% (Riodeíne[®], laboratório Rioquímica).

Após o membro ser devidamente isolado em pano de campo estéril, foi feita uma incisão de aproximadamente 1 cm através de pele e fáscia da musculatura plantar, tendo início 0,5 cm da borda do calcanhar e estendendo-se em direção aos dedos. Posteriormente, a musculatura plantar foi divulsionada e elevada de maneira a permitir sua incisão longitudinal e manter intacta a origem e inserção do músculo. O membro foi pressionado delicadamente para promover hemostasia seguido de sutura da pele com dois pontos de fio cirúrgico de nylon 5-0 (**Figura 18**). Após a cirurgia os animais foram alojados em gaiolas individuais com serralha nova, sendo aquecidos para melhor recuperação da anestesia, a qual ocorria entre uma e duas horas.

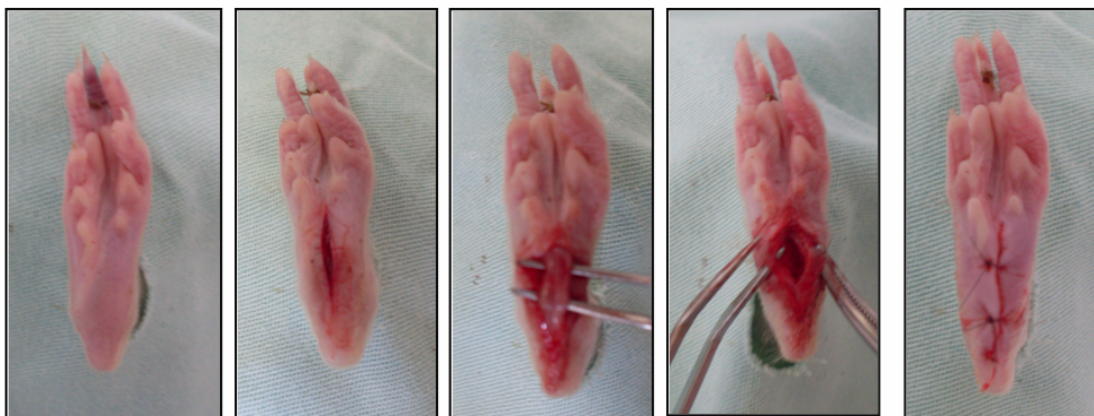


Figura 18. Procedimento cirúrgico (TEIXEIRA, 2010) na região plantar do membro posterior direito de ratos (adaptado de BRENNAN et al., 1996).

Todos os grupos, independente dos tratamentos empregados e de serem ou não submetidos ao procedimento incisional, foram submetidos aos testes de nocicepção em intervalos idênticos. Tanto para a avaliação da alodinia mecânica (*von Frey*) quanto para avaliação da hiperalgesia térmica (*Hargreaves*), foram seguidas as seguintes etapas (**Figura 19**):

1ª ETAPA (Nocicepção basal e cirurgia): os animais foram submetidos aos testes de nocicepção para obtenção de valores basais de latência, em gramas para o método *von Frey* e em segundos para o teste de *Hargreaves*. Posteriormente, os animais foram operados com o procedimento de incisão da região plantar, exceto em um dos grupos de animais controle. Nos três dias subsequentes, foram novamente realizados os testes de nocicepção para determinar a evolução da alodinia mecânica e da hiperalgesia térmica nos animais.

2ª ETAPA (Tratamentos e avaliação da hiperalgesia e alodinia): após o terceiro dia de avaliação (1ª etapa), foram feitos os tratamentos através de única administração oral com o veículo (água) ou com o extrato metanólico da *Cleome spinosa* (EMCS) na dose de 1g/kg. Após 30 minutos, 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas dos tratamentos, foram efetuados os testes para avaliar a efetividade analgésica dos mesmos.

3ª ETAPA (Avaliação da hiperalgesia e alodinia tardia): a avaliação nociceptiva pós-incisão foi realizada nos dias 7, 10 e 14, a fim de observarmos o curso da hiperalgesia e alodinia até o possível retorno a valores semelhantes aos basais.

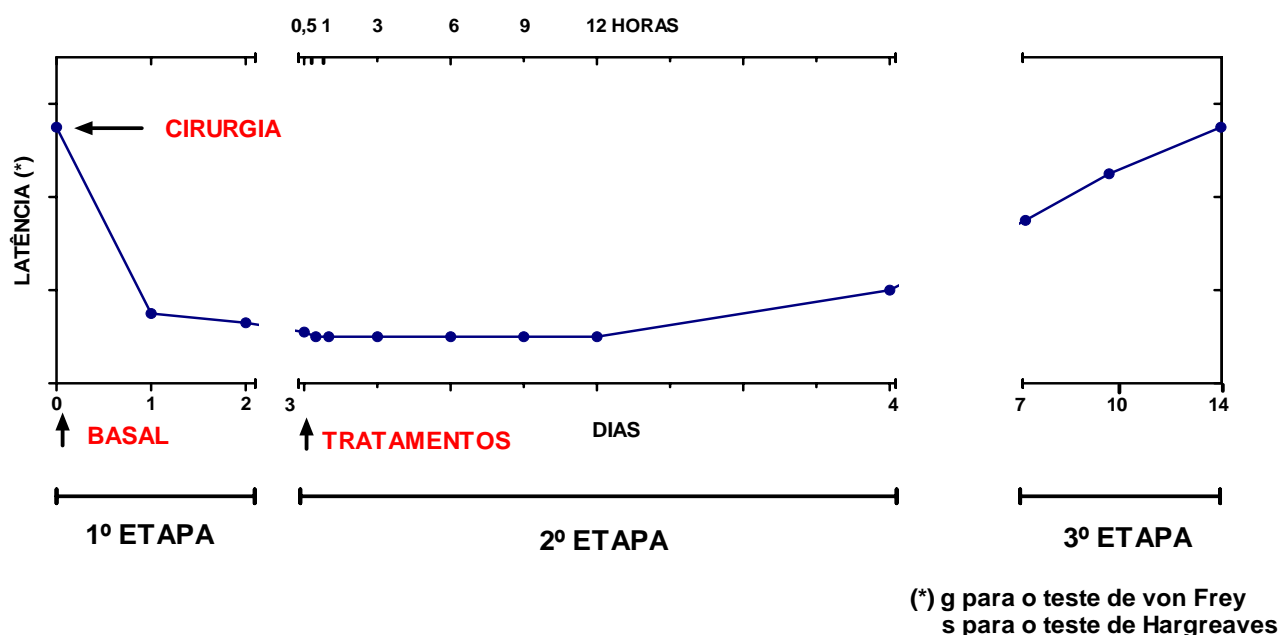


Figura 19. Delineamento experimental.

Após a obtenção das médias das latências nos testes de *Hargreaves* (segundos), e de *von Frey* (gramas), os resultados foram expressos, respectivamente, como porcentagem de inibição da hiperalgisia térmica (%IHT) ou porcentagem de inibição da hipernocicepção mecânica (%IHM), sendo este cálculo obtido através da fórmula:

$$\% \text{ IHM ou IHT} = \frac{\text{Latência pós-tratamento (GEMCS)} - \text{Latência pré-tratamento (GIV)}}{\text{Latência basal (GNIV)} - \text{Latência pré-tratamento (GIV)}} \times 100$$

Assim, a latência pós-tratamento representa os valores observados no grupo de animais incisados e submetidos ao tratamento com o EMCS (GEMCS), e a latência basal e latência pré-tratamento indicam, respectivamente, os valores médios obtidos no grupo não-incisado (GNIV) e no grupo incisado (GIV), ambos tratados com veículo.

Vale ressaltar que, na avaliação de todos os três grupos de animais, bem como nas diferentes etapas experimentais foram considerados, em média, as latências das avaliações de 8 animais para o teste de *Hargreaves* e de 10 animais para o teste de *von Frey*.

4.5.1.2.1 Avaliação da Hiperalgisia Térmica (Teste de *Hargreaves*)

O teste de *Hargreaves* foi descrito em 1988, e consiste no aquecimento, por meio de uma fonte radiante de luz infravermelha, da região central da planta da pata traseira de ratos. O comportamento nociceptivo é avaliado como a sensibilidade ao calor (hipernocicepção térmica), determinada pela latência em segundos (s) de retirada da pata do raio de luz.

Os animais foram posicionados manualmente e contidos delicadamente sobre o analgesímetro térmico modelo 7360 V-115 (Ugo-Basile), de forma que a região plantar do membro ficasse posicionado sobre a fonte de luz infravermelha. Após o correto posicionamento, a luz infravermelha com potência previamente estabelecida em 50 watts, foi

acionada juntamente com o cronômetro eletrônico até que o animal retirasse a pata, momento no qual a fonte de luz e relógio paravam automaticamente. A fim de evitar danos teciduais, estabeleceu-se o limite máximo de 20 segundos para exposição da pata ao raio infravermelho.

Foram realizadas duas ou três medidas, com um intervalo de tempo de 5 a 10 minutos entre as mesmas, sendo a média dessas medidas representante da latência (em segundos) da retirada da pata do estímulo, para os diferentes tempos da avaliação.

4.5.1.2.2 Avaliação da Alodinia Mecânica (Teste de *von Frey* eletrônico)

Durante o final de 1800, *von Frey* desenvolveu o teste de sensação de toque. Seu enfoque estava centralizado no estudo da fisiologia, sendo que apenas leves limites de toques foram avaliados. Em seus trabalhos, utilizava fios de cabelo e pêlos de cavalo com diâmetros e flexibilidade diferentes, para medir diferentes limiares de pressão e tato (BELL-KROTOSKI, 1984). O uso de filamentos de *von Frey* (VON FREY, 1896) é um método para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico bastante utilizado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. Primeiramente, esta técnica foi transformada em um método eletrônico em humanos (JENSEN et al., 1986) e posteriormente em ratos (MÖLLER et al., 1998).

Foi utilizado um analgesímetro digital modelo EFF 302 (Insight), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este.

Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de 5 mm² de vazão (tipo tela) de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 5 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Abaixo destas caixas de experimentação, espelhos foram posicionados a 25cm de distância para facilitar a visualização da região plantar dos animais. Foi aplicada uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal, por entre as malhas da rede, até que se observe uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, em geral até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata (CUNHA et al., 2004). A intensidade de hipernocicepção foi quantificada através da média de três valores, expressos em gramas, representando a latência de retirada da pata ao estímulo mecânico, em cada momento de avaliação.

4.5.1.3 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Conforme descrito por Koster e colaboradores (1959), grupos de 8 camundongos foram tratados pela via oral (*p.o.*), com o veículo (água), com o F₁₀₋₁₆ nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0mg/kg, ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg). Após 60 minutos dos tratamentos, foi injetado ácido acético diluído em salina (1,2%; 10mL/kg, *i.p.*) em todos os animais e as contorções abdominais, consideradas como contrações da parede abdominal seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores (VACHER et al., 1964), foram contadas por 30 minutos. Para isto, os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, com um período de adaptação prévia de 15 minutos. Os resultados foram expressos como média ± EPM dos números de contorções acumuladas durante os 30 minutos

de avaliação, permitindo dessa forma, através de regressão linear a determinação da dose inibitória 50% (ID₅₀).

4.5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória em camundongos

4.5.2.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina

Objetivando avaliar a exsudação plasmática e a migração leucocitária para a cavidade pleural após um estímulo flogístico (LEVY, 1969), e seguindo a metodologia modificada da descrita por Saleh e colaboradores (1999), grupos experimentais de 10 camundongos receberam 200µL de uma solução de azul de Evans a 2,5% pelo plexo orbital. Após 2 horas, estes foram tratados pela via oral (*p.o.*) com o veículo (água), com o extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* (EMCS; 1g/kg), com os flavonóides F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg), ou com o controle positivo dexametasona (2mg/kg). Após uma hora dos tratamentos foi induzida pleurisia através da injeção intra-torácica (*i.t.*) de 100µL de carragenina preparada a 1% em salina estéril. Para isto, foi utilizada uma cânula adaptada, preparada com uma agulha de insulina (26 G) envolta por uma cânula de polietileno, de modo que somente o bisel da agulha ficasse exposto. Vale ressaltar que a preparação da seringa com a carragenina foi feita imediatamente antes de sua administração, a fim de evitar contaminações, bem como evitar a geleificação da suspensão a ser injetada.

Após 4 horas, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo realizada a abertura da cavidade pleural para lavagem com 1000µL de solução de PBS heparinizado (20UI/mL), coletando-se o lavado em tubos Eppendorf® imersos em gelo. As amostras que foram contaminadas com sangue foram descartadas. Uma alíquota de 20µL do lavado pleural de cada animal foi transferida para um Eppendorf® contendo 380µL de líquido de Türk, possibilitando assim a coloração dos leucócitos e sua posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média ± EPM do número de leucócitos totais/mL.

Uma alíquota de 500µl do grupo tratado com EMCS (1g/kg), F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg) foi transferida para um tubo de ensaio contendo 500 µl de PBS heparinizado (20UI/mL), centrifugando-se o tubo a 1.200 rpm, durante 10 minutos, para a separação de células. O sobrenadante foi coletado e colocado em cubetas para realização das leituras de absorvância no espectrofotômetro de ELISA, em comprimento de onda 600 nm. Desta forma foi possível determinar a concentração do azul de Evans presente no lavado, que traduz o extravasamento protéico-lasmático para a cavidade pleural. Os resultados foram expressos como média ± EPM da concentração (mg/mL) do azul de Evans no lavado pleural (COSTA et al., 2006).

4.5.2.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina

Segundo descrito por Passos e colaboradores (2006), grupos de 8 camundongos foram pré-tratados *p.o.* com o veículo (água), com os flavonóides F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg), ou com a indometacina (10mg/kg). Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de 50 µL de carragenina (300 µg/pata) 1% na pata posterior direita. A pata posterior esquerda (contralateral) foi utilizada como controle, recebendo uma injeção contendo o mesmo volume (50µL) de solução salina (NaCl 0,9 %). Após a injeção de carragenina, o edema foi avaliado com o uso do aparelho pletismômetro nos intervalos de tempo de 1, 2, 3 e 4 horas, após a injeção do agente flogístico. A formação do edema foi avaliada pela diferença de volume (Δ) das patas direita e esquerda.

4.5.3 Avaliação de mecanismos de ação

4.5.3.1 Dosagem *ex vivo* de TNF- α

Objetivando investigar o envolvimento da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no mecanismo de ação anti-inflamatória presente no EMCS e nos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, procedeu-se a determinação da concentração desta citocina em alíquotas (20 μ L) do lavado pleural de grupos tratados com o EMCS (1g/kg) e com os flavonóides (ambos na dose de 2mg/kg) no teste da pleurisia. Para isto, foi utilizado um kit de imunoenensaio enzimático (ELISA Kit Mouse TNF-alpha, RayBio[®]), o qual mensura a concentração de TNF- α na amostra através do método de ELISA, semelhante ao estudo de Ramana e colaboradores (2007).

4.5.3.2 Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

Para avaliar a atividade das enzimas COX-1 e COX-2, foram utilizados os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (ambos nas doses de 200; 100; 50; 25; 12,5 e 6,75 μ g/mL) sem haver passagem por testes em animais, a fim de verificar seu efeito direto sobre a atividade destas cicloxigenases. Para isto, foi utilizado um kit de imunoenensaio enzimático (Colometric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical[®]), que determina através do método de ELISA o percentual de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 frente à utilização de flavonóides isolados da *Cleome spinosa*, podendo-se determinar de maneira mais específica a via da cascata inflamatória que é potencialmente inibida por estes compostos.

4.5.3.3 Ensaio enzimático da fosfolipase A₂

Para analisar a atividade de inibição dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre a atividade da PLA₂, foi utilizado um método modificado do descrito Habermann e Hardt (1972) para a quantificação da ação de fosfolipase de peçonha de cobras e avaliação de substâncias inibidoras (GUTIÉRREZ et al., 1988; FORTES-DIAS et al., 1999). A peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* foi utilizada como fonte de PLA₂. A uma solução de agarose (0,6%) em tampão Tris 0,05M (pH 7,5) foi adicionado 0,96% de suspensão de gema de ovo (1:3 em salina) e 0,96% de solução CaCl₂ 0,01M, sendo transferido 25mL desta para placas de petri (10 cm de diâmetro). Após solidificação do gel, foram perfuradas 10 cavidades equidistantes com 2mm de diâmetro. Misturou-se 100 μ L de peçonha (250 μ g/mL em solução tampão) com 100 μ L do flavonóide F₁₀₋₁₆, do F₁₁₋₁₃ ou veículo (tampão fosfato), e todos foram incubados a 37°C durante uma hora. Desta mistura, foram tomados 10 μ L e adicionados em cada poço. Para cada concentração foram feitas cinco replicatas. As placas foram incubadas a 50°C por 20 horas e, em seguida, os halos produzidos pela atividade da PLA₂ foram medidos (mm²) com a utilização de um paquímetro. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da área dos halos em percentagem relativa ao grupo controle.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os métodos de avaliação farmacológica utilizou-se o programa *GraphPad Prism 5* para realização da análise estatística. Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey ou teste *t* de student. Admitiu-se diferença significativa a partir de $p < 0,05$ (SOKAL; ROHLF, 1981).

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade antinociceptiva do EMCS

6.1.1 Teste da formalina

Foram avaliadas as fases de dor neurogênica (fase 1) e dor inflamatória (fase 2). Na fase 1, os grupos pré-tratados com o EMCS (1g/kg; *p.o.*) e morfina (10mg/kg; *s.c.*) apresentaram redução do tempo de reatividade, de 60,8% (23,7 ± 3,3s) e 99,3% (0,4 ± 0,2s) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (60,7 ± 4,7s) (Tabela 2 e Figura 20).

Tabela 2. Influência do pré-tratamento com o EMCS na dose de 1g/kg sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na 1ª fase do teste da formalina. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Reatividade (segundos)	% Inibição
Veículo (<i>p.o.</i>)	-	60,7 ± 4,7	-
EMCS (<i>p.o.</i>)	1000	23,7 ± 3,3	60,8 *
Indometacina (<i>p.o.</i>)	10	47,7 ± 4,8	-
Morfina (<i>s.c.</i>)	10	0,4 ± 0,2	99,3 ***

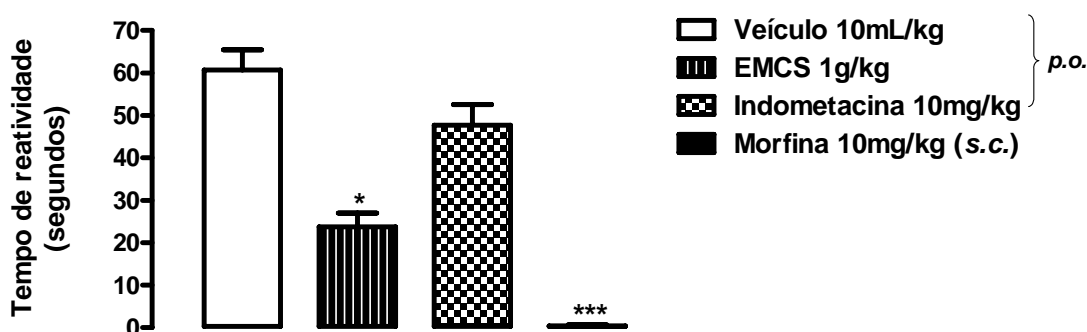


Figura 20. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na 1ª Fase do teste da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 10 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Na fase 2, o pré-tratamento dos animais com o EMCS (1g/kg; *p.o.*) ou com os controles positivos indometacina (10mg/kg; *p.o.*) ou morfina (10mg/kg; *s.c.*), foi capaz de reduzir o tempo de reatividade em 81,5% (43,5 ± 23,2s), 43,4% (133,4 ± 6,9s) e 99,7% (0,6 ± 0,4s) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (235,7 ± 21,5s) (Tabela 3 e Figura 21).

Tabela 3. Influência dos pré-tratamentos (*p.o.* ou *s.c.*) sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na 2ª fase do teste da formalina. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Reatividade (segundos)	% Inibição
Veículo (<i>p.o.</i>)	-	235,7 ± 21,47	-
EMCS (<i>p.o.</i>)	1000	43,5 ± 23,2	81,5 ***
Indometacina (<i>p.o.</i>)	10	133,4 ± 6,9	43,4 **
Morfina (<i>s.c.</i>)	10	0,6 ± 0,4	99,7 ***

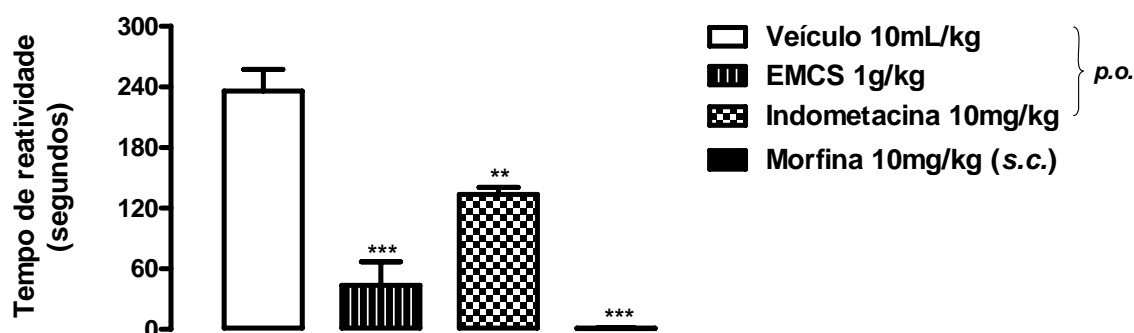


Figura 21. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na 2ª Fase do teste da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 10 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

6.1.2 Modelo de dor incisional em ratos

Utilizando-se três grupos experimentais de ratos, foi avaliado o potencial antinociceptivo do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa*, através dos testes de *von Frey* e *Hargreaves*. Dois grupos controles foram tratados com veículo, sendo um submetido ao procedimento cirúrgico de incisão plantar (GIV – grupo incisado veículo), permitindo a obtenção de valores para o controle positivo do teste. Outro grupo foi tratado e não submetido à realização da incisão plantar (GNIV- grupo não incisado veículo), fornecendo os valores controle negativo ou basal. O terceiro grupo (GEMCS) foi submetido ao procedimento cirúrgico e recebeu tratamento pela via oral com o EMCS (1g/kg).

6.1.2.1 Avaliação da hiperalgesia térmica (Teste de *Hargreaves*)

Na primeira etapa do experimento, não foi observada diferença estatística entre os valores basais dos três grupos experimentais, conforme apresentados na Tabela 4 e Figura 9. Neste período de observação, o grupo GNIV apresentou valores de latência média de 15,6 ± 0,7s, havendo apenas pequenas oscilações de valores durante os quatorze dias de avaliação experimental. Semelhante ao grupo GNIV, o grupo GIV apresentou valores basais médios de latência de 11,4 ± 0,9s, apresentando uma queda progressiva após o procedimento cirúrgico,

atingindo valores basais mínimos de $5,4 \pm 0,5s$, ao terceiro dia. O grupo GEMCS apresentou valores basais de $13,9 \pm 1,0s$ e, assim como o grupo GIV, demonstrou queda acentuada até o terceiro dia de avaliação ($4,3 \pm 0,3s$).

Na segunda etapa do experimento, após o tratamento (*p.o.*) com o EMCS na dose de 1g/kg, observou-se um progressivo e significativo aumento na latência, em relação ao grupo veiculo incisado (GIV), com percentuais de inibição da hiperalgesia térmica (%IHT) de 45,8% ($8,7 \pm 1,0s$), 45,9% ($8,7 \pm 0,9s$), 47,0% ($8,9 \pm 0,6s$), 58,2% ($9,9 \pm 0,4s$) nos tempos de 3, 6, 9 e 12h (Tabela 4 e Figura 22).

Na terceira etapa, as leituras do grupo GEMCS realizadas nos dias 7, 10 e 14 após a cirurgia não demonstraram valores de IHT significativos quando comparados ao grupo GIV, não se observando recuperação da latência até valores basais próximos ao grupo GNIV, assim como o grupo GIV (Tabela 4 e Figura 22).

Tabela 4. Influência do tratamento com o EMCS (1g/kg) sobre a hiperalgesia térmica (médias \pm erro padrão da latência em segundos) induzida pela incisão na região plantar, obtida através do método de *Hargreaves*, e percentuais de inibição da hiperalgesia térmica (%IHT). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. n = 8 animais em média.

	<i>Hargreaves</i> LEITURAS	GRUPOS / LATÊNCIAS (segundos)			% IHT
		GNIV	GEMCS	GIV	
Primeira Etapa	Basal	$15,6 \pm 0,7$	$13,9 \pm 1,0$	$11,4 \pm 0,9$	-
	1º Dia	$15,6 \pm 0,9$	$6,3 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,6$	
	2º Dia	$15,3 \pm 1,2$	$5,0 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,8$	
	3º Dia	$14,7 \pm 0,9$	$4,3 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,5$	
Segunda Etapa	30 minutos	$14,9 \pm 0,9$	$4,5 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,4$	-
	1 Hora	$14,7 \pm 1,2$	$5,9 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,4$	-
	3 Horas	$14,6 \pm 0,7$	$8,7 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,4$	32,9*
	6 Horas	$14,1 \pm 0,9$	$8,7 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,4$	31,6*
	9 Horas	$14,5 \pm 0,5$	$8,9 \pm 0,6$	$5,9 \pm 0,7$	34,9*
	12 Horas	$14,2 \pm 1,1$	$9,9 \pm 0,4$	$6,4 \pm 0,5$	44,9**
	24 Horas	$15,3 \pm 1,1$	$5,6 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,7$	-
Terceira Etapa	7º Dia	$16,4 \pm 1,2$	$8,6 \pm 1,0$	$7,4 \pm 0,7$	-
	10º Dia	$16,6 \pm 0,9$	$9,2 \pm 0,8$	$8,2 \pm 0,3$	-
	14º Dia	$16,6 \pm 1,0$	$11,6 \pm 1,2$	$10,6 \pm 0,7$	-

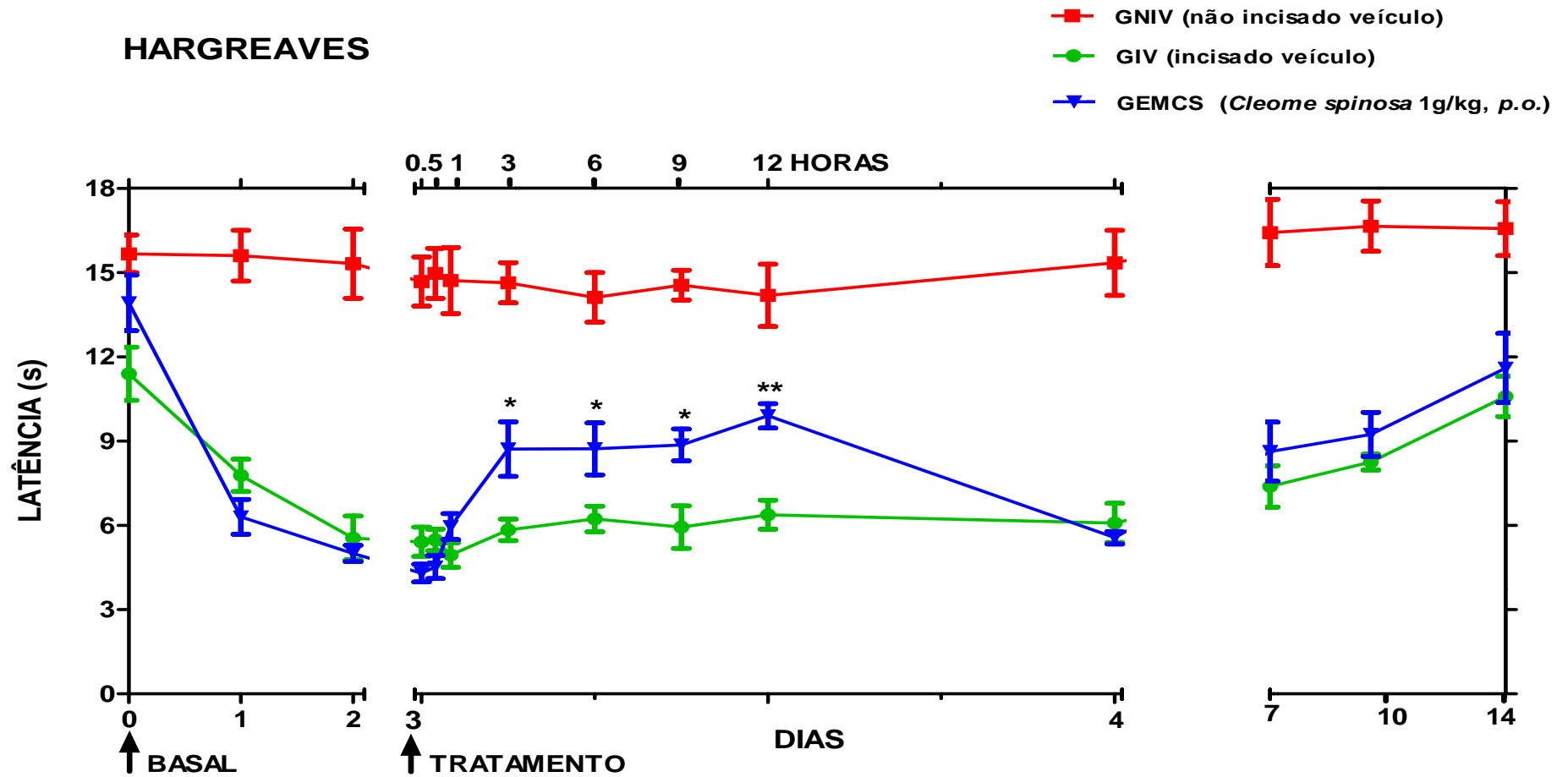


Figura 22. Influência do tratamento com o EMCS (1g/kg, p.o.) sobre a hiperalgesia térmica (médias \pm erro padrão da latência em segundos) induzida pela incisão na região plantar, obtida através do método de *Hargreaves*. Os símbolos (■ GNIV, ● GIV e ▼ GEMCS) e barras verticais representam as médias \pm erro padrão das variações da latência em segundos dos grupos experimentais contendo oito animais em média. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6.1.2.2 Avaliação da alodinia mecânica (Teste de *von Frey* eletrônico)

Na primeira etapa do experimento, não foi observada diferença estatística entre os valores basais dos três grupos experimentais, conforme apresentados na Tabela 3 e Figura 32. Neste período de observação, o grupo GNIV apresentou valores de latência média de $72,5 \pm 2,3$ g, havendo apenas pequenas oscilações de valores durante os quatorze dias de avaliação experimental. Semelhante ao grupo GNIV, o grupo GIV apresentou valores basais médios de latência de $72,4 \pm 3,3$ g, apresentando uma queda progressiva após o procedimento cirúrgico, atingindo valores basais mínimos de $8,7 \pm 0,6$ g ao terceiro dia. O grupo EMCS apresentou valores basais de $70,1 \pm 3,5$ g e, assim como o grupo GIV, demonstrou queda acentuada até o terceiro dia de avaliação ($9,9 \pm 1,4$ g).

Na segunda etapa do experimento, após o tratamento (*p.o.*) com o EMCS na dose de 1g/kg, observou-se um progressivo e significativo aumento na latência, em relação ao grupo veiculo incisado (GIV), com percentuais de inibição da alodinia mecânica (%IAM) de 8,9% ($12,9 \pm 0,8$ g), 19,5% ($19,6 \pm 2,3$ g), 25,5% ($23,4 \pm 1,4$ g), 27,4% ($24,6 \pm 1,8$ g) e 38,4% ($31,6 \pm 1,6$ g) nos tempos de 1, 3, 9, 12 e 24h, respectivamente (Tabela 5 e Figura 23).

Na terceira etapa, objetivando-se avaliar a recuperação da latência até valores basais próximos ao grupo GNIV, as leituras realizadas nos dias 7, 10 e 14 após a cirurgia demonstraram valores de IAM de 42,3% ($34,1 \pm 2,2$ g), 62,6% ($47,0 \pm 3,0$ g) e 78,3% ($56,9 \pm 3,9$ g), respectivamente (Tabela 5). Contudo, o grupo de animais tratados com o EMCS não alcançou valores semelhantes ao grupo GNIV, assim como o grupo GIV (Tabela 5 e Figura 23).

Tabela 5. Influência do tratamento com o EMCS (1g/kg) sobre a alodinia mecânica (médias \pm erro padrão da latência em gramas) induzida pela incisão na região plantar, obtida através do método *von Frey* e percentuais de inibição da alodinia mecânica (%IAM). *** $p < 0,001$, n = 10 animais em média.

	<i>von Frey</i> LEITURAS	GRUPOS / LATÊNCIAS (gramas)			% IAM
		GNIV	GEMCS	GIV	
Primeira Etapa	Basal	$72,5 \pm 2,3$	$70,1 \pm 3,6$	$72,4 \pm 3,3$	--
	1º Dia	$73,9 \pm 2,4$	$17,9 \pm 3,5$	$12,3 \pm 1,9$	
	2º Dia	$72,4 \pm 2,4$	$9,9 \pm 1,4$	$7,8 \pm 0,8$	
	3º Dia	$72,1 \pm 2,7$	$7,2 \pm 0,3$	$8,7 \pm 0,6$	
Segunda Etapa	30 Minutos	$71,8 \pm 2,5$	$11,6 \pm 1,3$	$8,1 \pm 1,3$	
	1 Hora	$71,1 \pm 2,1$	$12,9 \pm 0,8$	$7,6 \pm 0,8$	8,3***
	3 Horas	$71,4 \pm 2,0$	$19,6 \pm 2,3$	$9,1 \pm 0,9$	16,8***
	6 Horas	$74,0 \pm 1,6$	$16,2 \pm 1,1$	$14,9 \pm 0,8$	--
	9 Horas	$72,7 \pm 2,0$	$23,4 \pm 1,4$	$11,2 \pm 0,9$	19,8***
	12 Horas	$69,5 \pm 2,2$	$24,6 \pm 1,8$	$12,1 \pm 1,4$	21,6***
	24 Horas	$73,7 \pm 2,8$	$31,6 \pm 1,6$	$13,9 \pm 3,2$	29,6***
Terceira Etapa	7º Dia	$73,2 \pm 2,4$	$34,1 \pm 2,1$	$19,6 \pm 1,5$	27,0***
	10º Dia	$74,3 \pm 2,0$	$47,0 \pm 3,0$	$29,6 \pm 2,5$	38,9***
	14º Dia	$72,1 \pm 1,0$	$56,9 \pm 3,9$	$30,2 \pm 1,7$	63,7***

VON FREY

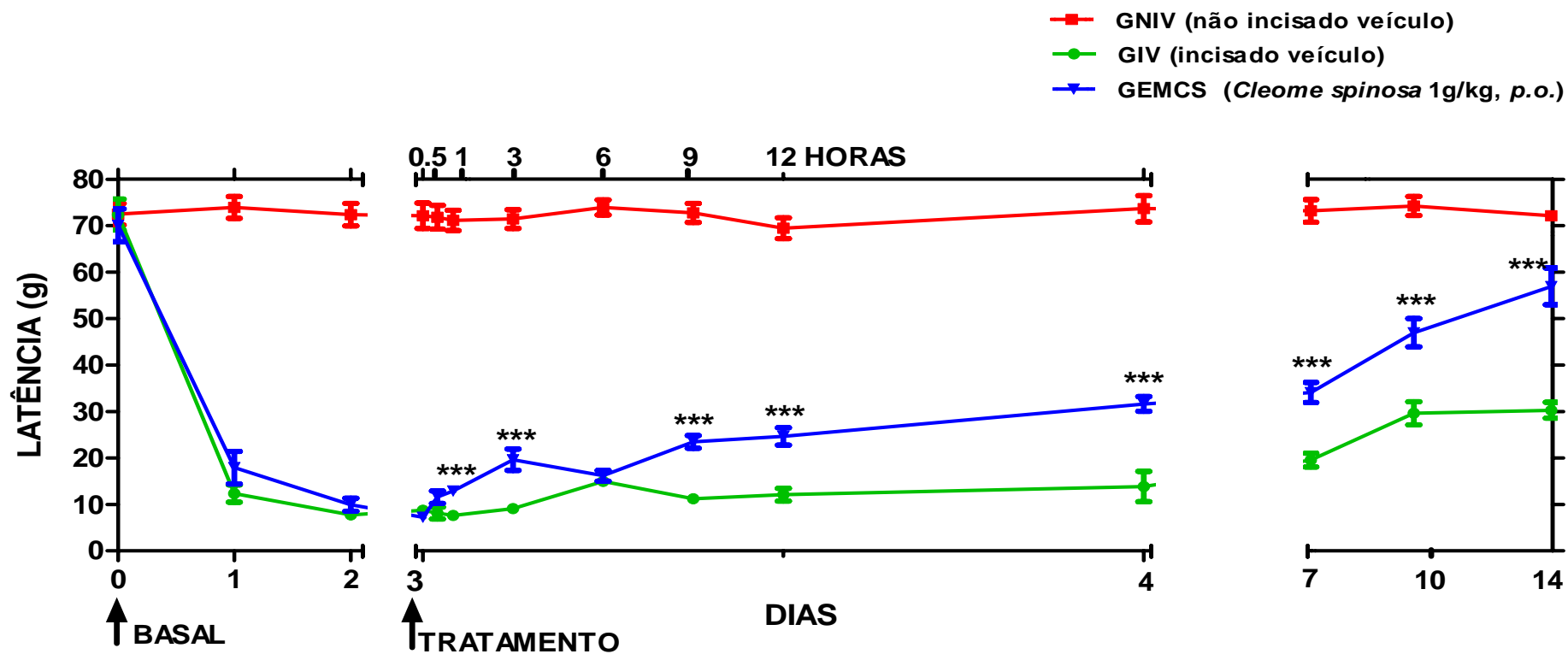


Figura 23. Influência do tratamento com o EMCS (1g/kg, p.o.) sobre a alodinia mecânica (médias \pm erro padrão da latência em gramas) induzida pela incisão na região plantar, obtida através do método de *von Frey*. Os símbolos (■ GNIV, ● GIV e ▼ GEMCS) e barras verticais representam as médias \pm erro padrão das variações da latência em gramas dos grupos experimentais contendo dez animais em média. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6.2 Avaliação da atividade antinociceptiva dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃

6.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Após o pré-tratamento (*p.o.*) de grupos de camundongos (n=8) com o F₁₀₋₁₆ nas doses de 1,0 e 2,0mg/kg, ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg), observou-se redução dose x efeito do número de contorções abdominais de 34,1% (42,0 ± 2,7 contorções), 46,6% (34,0 ± 3,2 contorções) e 62,0% (24,2 ± 2,8 contorções) respectivamente, quando comparado com o grupo controle veículo (63,7 ± 4,6 contorções) (Tabela 7 e Figura 24).

Tabela 7. Influência do pré-tratamento com o F₁₀₋₁₆ nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/kg sobre o número de contorções no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. ***p*<0,01 e ****p*<0,001

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Número de contorções (30 minutos)	% Inibição
Veículo	-	63,7 ± 4,6	-
F ₁₀₋₁₆	0,5	58,7 ± 3,5	-
F ₁₀₋₁₆	1,0	42,0 ± 2,7	34,1 **
F ₁₀₋₁₆	2,0	34,0 ± 3,2	46,6 ***
Indometacina	10	24,2 ± 2,8	62,0 ***

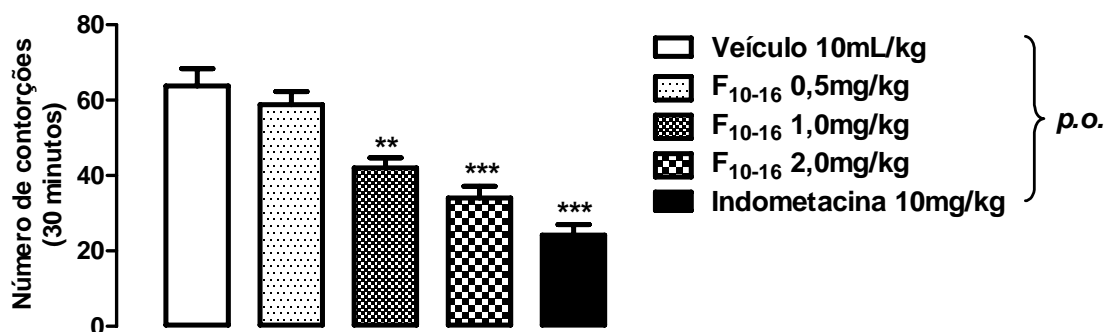


Figura 24. Número de contorções no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. ***p*<0,01 e ****p*<0,001

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pelo método das contorções abdominais, permitiu, por interpolações, o cálculo da dose inibitória 50% (ID₅₀) para o composto F₁₀₋₁₆, que foi de 1,47mg/kg (Figura 25).

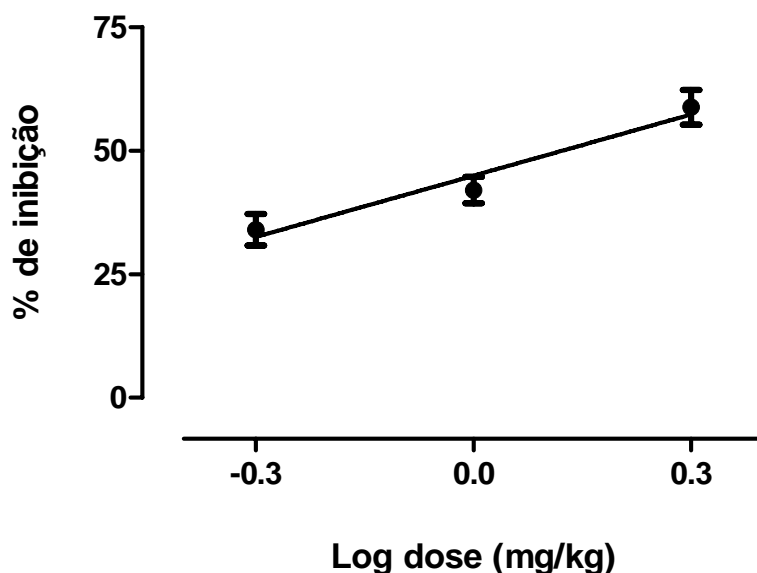


Figura 25. Dose inibitória 50% (ID₅₀) das contorções abdominais induzidas por ácido acético (1,2% em salina, 100μL/10g, *i.p.*) em camundongos previamente tratados (*p.o.*) com o F₁₀₋₁₆ nas doses de 0,5; 1,0 e 2,0mg/kg. Os símbolos e linhas verticais representam as médias ± o erro padrão de 8 animais por grupo.

6.2.2 Teste da formalina

De maneira semelhante ao ensaio anterior com o EMCS (1g/kg), foram avaliadas as fases neurogênica e inflamatória da dor. Na fase 1 não foi observado diferença estatisticamente significativa quando grupos de animais (n=10) foram pré-tratados com os flavonóides F₁₀₋₁₆ (58,6 ± 8,3s) ou F₁₁₋₁₃ (52,0 ± 6,5s), quando comparados ao grupo veículo (60,7± 4,7s) (**Figura 26**).

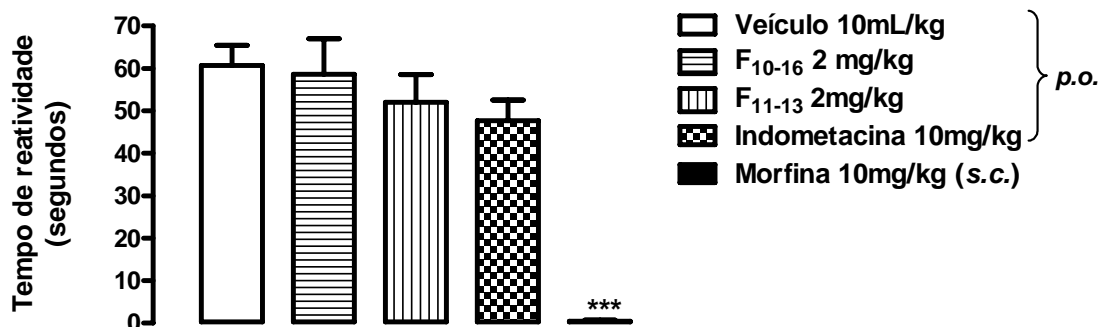


Figura 26. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na 1ª Fase do teste da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 10 animais. *** $p < 0,001$

Na fase 2, o pré-tratamento dos animais com o F₁₀₋₁₆ (2mg/kg; *p.o.*), F₁₁₋₁₃ (2mg/kg; *p.o.*), ou com os controles positivos indometacina (10mg/kg; *p.o.*) ou morfina (10mg/kg; *s.c.*), foi capaz de reduzir o tempo de reatividade em 51,4% (114,5±13,2s), 38,7% (144,5±12,2s), 43,4% (133,4±6,9s) e 99,7% (0,6±0,4s) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (235,7± 21,5s) (**Tabela 8 e Figura 27**).

Tabela 8. Influência do pré-tratamento com os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre o tempo de reatividade (segundos) dos animais na 2ª fase do teste da formalina. ***p*<0,01 e ****p*<0,001

Tratamentos	Dose (mg/kg)	Reatividade (segundos)	% Inibição
Veículo (<i>p.o.</i>)	-	235,7 ± 21,47	-
F ₁₀₋₁₆ (<i>p.o.</i>)	2	114,5 ± 13,2	51,4 ***
F ₁₁₋₁₃ (<i>p.o.</i>)	2	144,5 ± 12,2	38,7 **
Indometacina (<i>p.o.</i>)	10	133,4 ± 6,9	43,4 **
Morfina (<i>s.c.</i>)	10	0,6 ± 0,4	99,7 ***

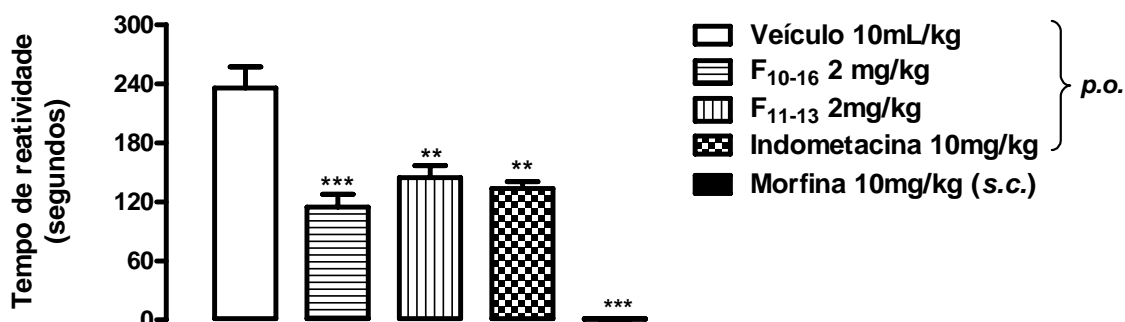


Figura 27. Tempo de reatividade (segundos) dos animais na 2ª Fase do teste da formalina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 10 animais. ***p*<0,01 e ****p*<0,001

6.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EMCS

6.3.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina

Após o pré-tratamento (*p.o.*) de grupos de camundongos (n=8) com o EMCS (1g/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2mg/kg), observou-se inibição da migração leucocitária para a cavidade pleural de 37,1% (4,1±0,3 x 10⁶ leucócitos/mL) e 54,6% (2,9±0,2 x 10⁶ leucócitos/mL) respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (6,6 ± 0,3 x 10⁶ leucócitos/mL) (**Tabela 9 e Figura 28**).

Tabela 9. Influência do pré-tratamento com o EMCS na dose de 1g/kg sobre a contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina. *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Leucócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)	% Inibição
Veículo	-	$6,5 \pm 0,3$	-
EMCS	1000	$4,1 \pm 0,3$	37,1 ***
Dexametasona	2	$2,9 \pm 0,2$	54,6 ***

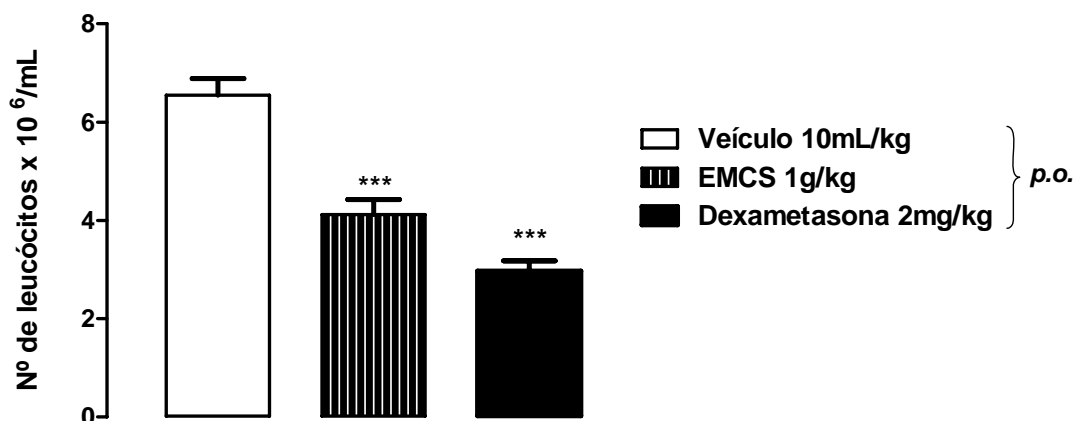


Figura 28. Avaliação da migração leucocitária através da contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. *** $p < 0,001$

Além disto, a observação dos valores de absorvância, utilizando-se a curva do azul de Evans, evidenciou que o pré-tratamento (*p.o.*) do mesmo grupo de animais ($n=8$) supracitado, com o EMCS (1g/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2mg/kg), garantiu a redução do extravasamento plasmático para a cavidade pleural de 32,1% ($3,9 \pm 0,5\text{mg/mL}$) e 49,3% ($2,8 \pm 0,3\text{mg/mL}$) respectivamente, quando comparado ao grupo veículo ($5,6 \pm 0,3\text{mg/mL}$) (Tabela 10 e Figura 29).

Tabela 10. Influência do pré-tratamento com o EMCS na dose de 1g/kg sobre a concentração protéica plasmática no teste da pleurisia induzida por carragenina. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Concentração(mg/mL)	% Inibição
Veículo	-	$5,6 \pm 0,3$	-
EMCS	1000	$3,9 \pm 0,5$	32,1 *
Dexametasona	2	$2,8 \pm 0,3$	49,3 ***

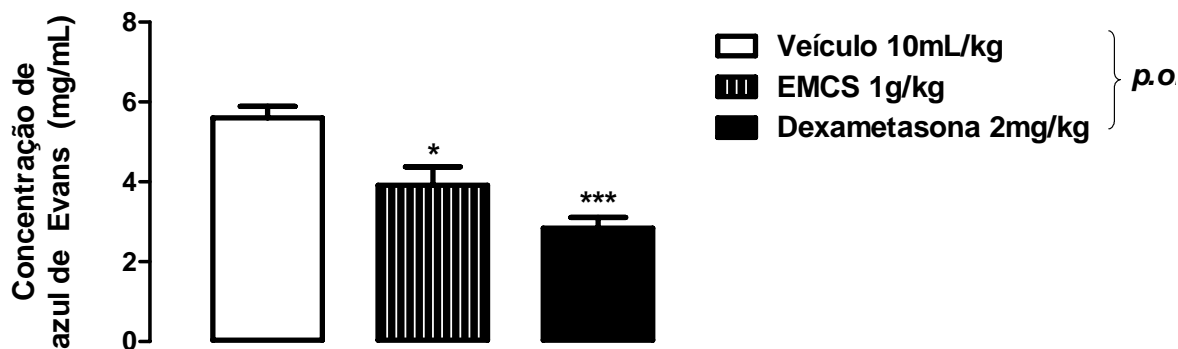


Figura 29. Avaliação da exsudação protéica através da determinação da concentração plasmática de azul de Evans no teste da pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$

6.4 Avaliação de mecanismos de ação do EMCS

6.4.1 Dosagem *ex vivo* de TNF- α

Utilizando uma alíquota (20 μ l) do lavado pleural obtido do grupo tratado com o EMCS (1g/kg) no teste da pleurisia induzida por carragenina observou-se, através do kit de imunoenensaio enzimático (ELISA Kit Mouse TNF-alpha, RayBio[®]), uma diminuição na concentração de TNF- α de 29,4% ($0,16 \pm 0,01$ pg/mL) quando comparado ao grupo veículo ($0,22 \pm 0,02$ pg/mL) (**Tabela 11 e Figura 30**).

Tabela 11. Influência do pré-tratamento com o EMCS (1g/kg) sobre a concentração da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) através do método de ELISA. * $p < 0,05$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Concentração TNF- α (pg/mL)	% Inibição
Veículo	-	$8,6 \pm 0,2$	-
EMCS	1000	$5,0 \pm 0,06$	29,8 *

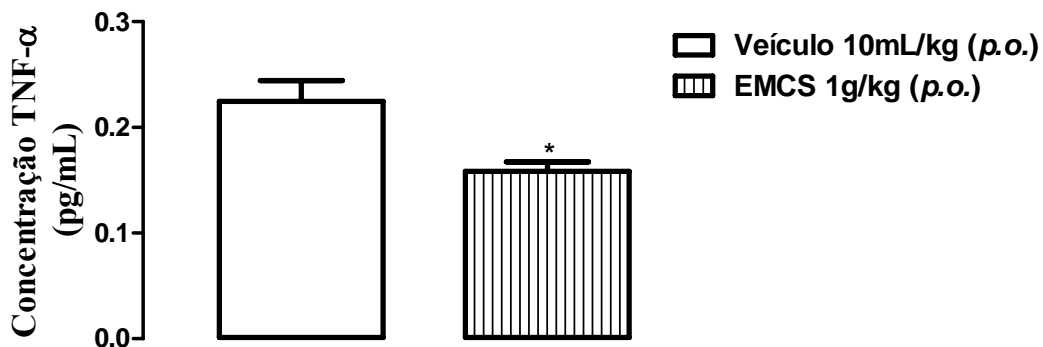


Figura 30. Concentração da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no lavado pleural do grupo de animais pré-tratados com o EMCS (1g/kg). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. * $p < 0,05$

6.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃

6.5.1 Teste da pleurisia induzida por carragenina

Após o pré-tratamento (*p.o.*) de grupos de camundongos ($n=10$) com o F₁₀₋₁₆ (2mg/kg), F₁₁₋₁₃ (2mg/kg) ou com o controle positivo dexametasona (2mg/kg), demonstraram inibição da migração leucocitária de 42,7% ($2,5 \pm 0,2 \times 10^6$ leucócitos/mL), 39,0% ($2,7 \pm 0,3 \times 10^6$ leucócitos/mL) e 60,8% ($1,7 \pm 0,1 \times 10^6$ leucócitos/mL), respectivamente, quando comparado com o grupo veículo ($4,4 \pm 0,3 \times 10^6$ leucócitos/mL) (Tabela 12 e Figura 31).

Tabela 12. Influência do pré-tratamento com os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (ambos 2mg/kg) sobre a contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina. *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Leucócitos ($\times 10^6$ /mL)	% Inibição
Veículo	-	$4,4 \pm 0,28$	-
F ₁₀₋₁₆	2	$2,5 \pm 0,2$	42,7 ***
F ₁₁₋₁₃	2	$2,7 \pm 0,3$	39,0 **
Dexametasona	2	$1,7 \pm 0,1$	60,8 **

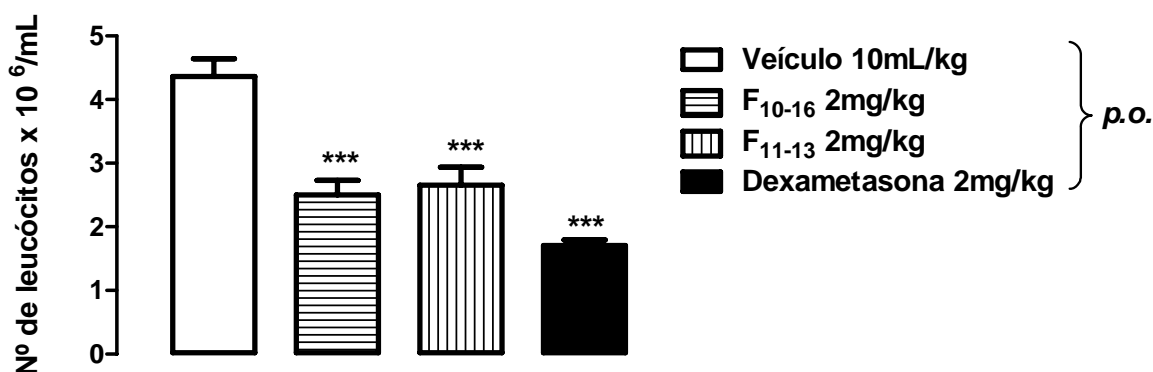


Figura 31. Avaliação da migração leucocitária através da contagem total de leucócitos no teste da pleurisia induzida por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 10 animais. *** $p < 0,001$

6.5.2 Teste do edema de pata induzido por carragenina

Foi realizada uma avaliação temporal da formação do edema induzido pela carragenina quando injetada por via intraplantar. O volume (μL) de solução salina deslocado pela pata no pletismômetro traduziu-se em quantidade de edema formado, através da diferença de volume (Δ) das patas direita e esquerda.

Na 1ª hora após os tratamentos, observou-se que os grupos pré-tratados (*p.o.*) com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg), apresentaram redução da formação do edema de 39,4% ($85,7 \pm 11,3\mu\text{L}$), 32,8% ($95,0 \pm 7,6\mu\text{L}$) e 27,9% ($102,0 \pm 11,6\mu\text{L}$) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ($141,4 \pm 8,1\mu\text{L}$) (Tabela 13 e Figura 32).

Tabela 13. Influência do pré-tratamento com F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg) e Indometacina (10mg/kg) sobre a formação do edema de pata induzido por carragenina, na 1ª hora de avaliação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Δ (volume pata direita - pata esquerda) em μL	% Inibição
Veículo	-	$141,4 \pm 8,1$	-
F ₁₀₋₁₆	2	$85,7 \pm 11,3$	39,4 ***
F ₁₁₋₁₃	2	$95,0 \pm 7,6$	32,8 **
Indometacina	10	$102,0 \pm 11,6$	27,9 *

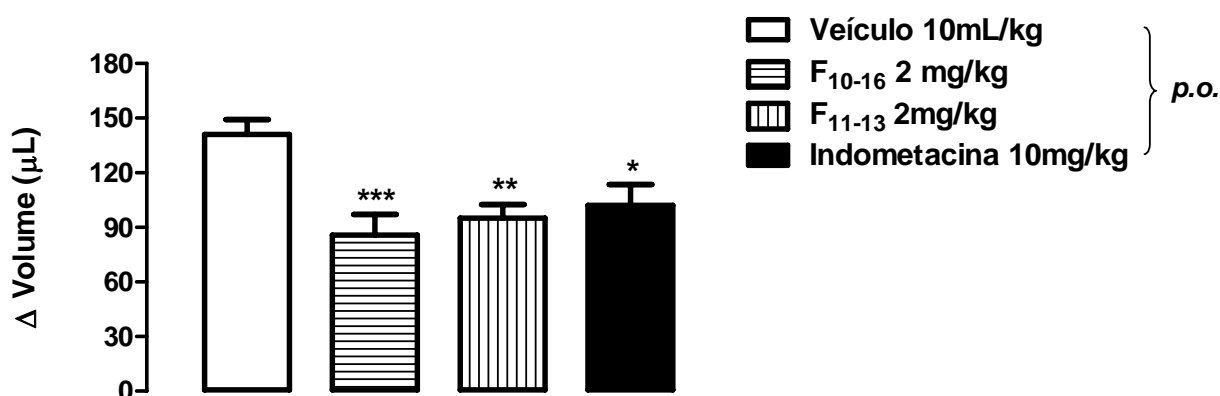


Figura 32. Avaliação da formação do edema na 1ª hora de avaliação do teste do edema de pata induzido por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Na 2ª hora de avaliação, observou-se que os grupos pré-tratados (*p.o.*) com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg), apresentaram redução da formação do edema de 47,1% (71,4 ± 6,3μL), 43,7% (76,0 ± 4,0μL) e 50,0% (67,5 ± 10,3μL) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (135,0 ± 3,4μL) (**Tabela 14 e Figura 33**).

Tabela 14. Influência do pré-tratamento com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg) e Indometacina (10mg/kg) sobre a formação do edema de pata induzido por carragenina, na 2ª hora de avaliação. *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Δ (volume pata direita - pata esquerda) em μL	% Inibição
Veículo	-	135,0 ± 3,4	-
F ₁₀₋₁₆	2	71,4 ± 6,3	47,1 ***
F ₁₁₋₁₃	2	76,0 ± 4,0	43,7 ***
Indometacina	10	67,5 ± 10,3	50,0 ***

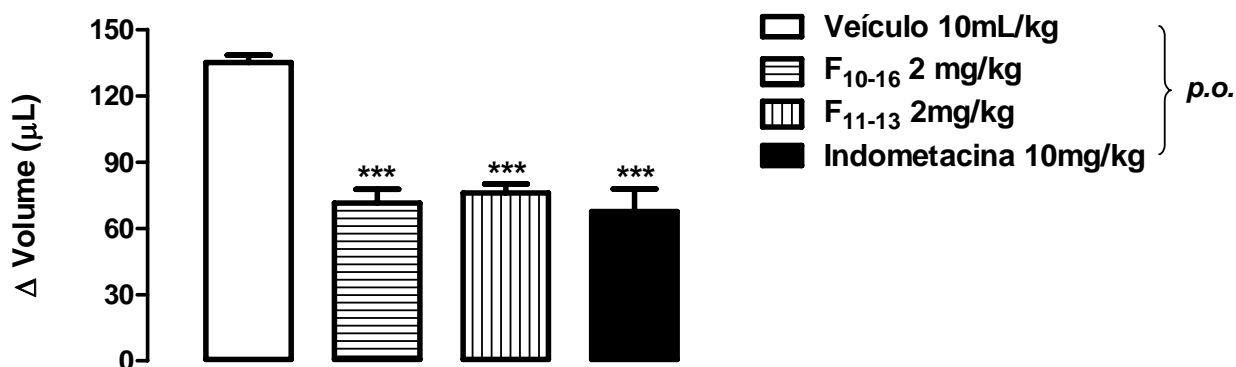


Figura 33. Avaliação da formação do edema na 2^a hora de avaliação do teste do edema de pata induzido por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. *** $p < 0,001$

Na 3^a hora após os tratamentos, observou-se que os grupos pré-tratados (*p.o.*) com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg), apresentaram redução da formação do edema de 38,8% ($74,3 \pm 4,3\mu\text{L}$), 36,1% ($77,5 \pm 2,5\mu\text{L}$) e 44,2% ($67,5 \pm 7,5\mu\text{L}$) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ($118,6 \pm 4,6\mu\text{L}$) (Tabela 15 e Figura 34).

Tabela 15. Influência do pré-tratamento com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg) e Indometacina (10mg/kg) sobre a formação do edema de pata induzido por carragenina, na 3^a hora de avaliação. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Δ (volume pata direita - pata esquerda) em μL	% Inibição
Veículo	-	121,3 ± 4,0	-
F ₁₀₋₁₆	2	74,3 ± 4,3	38,8 ***
F ₁₁₋₁₃	2	77,5 ± 2,5	36,1 **
Indometacina	10	67,5 ± 7,5	44,2 ***

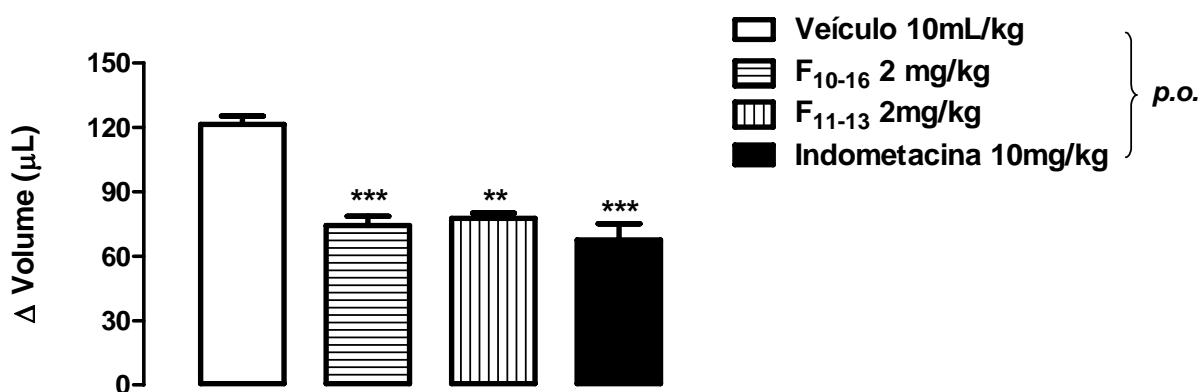


Figura 34. Avaliação da formação do edema na 3^a hora de avaliação do teste do edema de pata induzido por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias ± o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

Na 4^a hora após os tratamentos, observou-se que os grupos pré-tratados (*p.o.*) com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ ou com o controle positivo indometacina (10mg/kg), apresentaram redução da formação do edema de 32,5% (80,0 ± 2,7μL), 34,2% (78,0 ± 5,8μL) e 55,7% (52,5 ± 6,3μL) respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (118,6 ± 4,6μL) (Tabela 16 e Figura 35).

Tabela 16. Influência do pré-tratamento com F₁₀₋₁₆, F₁₁₋₁₃ (ambos 2mg/kg) e Indometacina (10mg/kg) sobre a formação do edema de pata induzido por carragenina, na 4^a hora de avaliação. *** $p < 0,001$

Tratamentos (<i>p.o.</i>)	Dose (mg/kg)	Δ (volume pata direita - pata esquerda) em μL	% Inibição
Veículo	-	118,6 ± 4,6	-
F ₁₀₋₁₆	2	80,0 ± 2,7	32,5 ***
F ₁₁₋₁₃	2	78,0 ± 5,8	34,2 ***
Indometacina	10	52,5 ± 6,3	55,7 ***

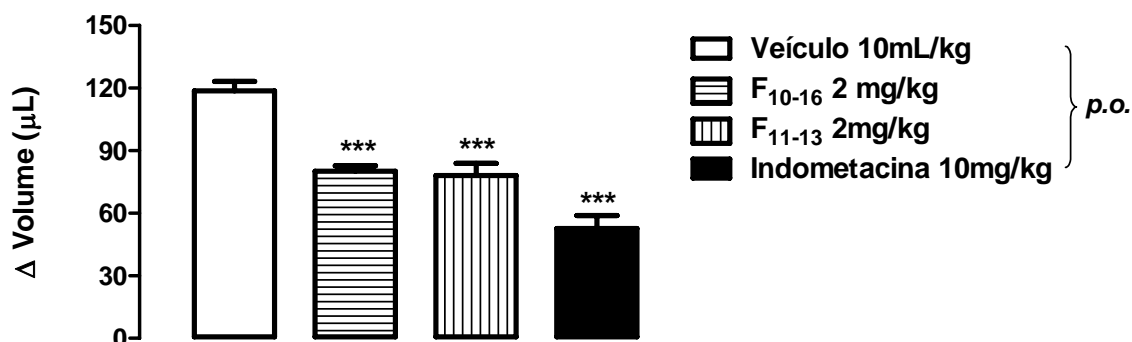


Figura 35. Avaliação da formação do edema na 4ª hora de avaliação do teste do edema de pata induzido por carragenina. As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. *** $p < 0,001$

6.6 Avaliação de mecanismos de ação dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃

6.6.1 Dosagem *ex vivo* de TNF- α

Foi verificada a atividade dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre a formação do TNF- α , utilizando-se o mesmo kit de ELISA e uma alíquota (20 μ l) do lavado pleural obtido do grupo tratado com estes flavonóides (2mg/kg) no teste da pleurisia induzida por carragenina. Observou-se que os grupos de animais pré-tratados com o F₁₀₋₁₆ e com o F₁₁₋₁₃ apresentaram uma diminuição na concentração de TNF- α de 8,5% (0,21 \pm 0,006pg/mL) e 11,5% (0,19 \pm 0,004pg/mL) respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (0,22 \pm 0,004pg/mL) (Tabela 17 e Figura 36).

Tabela 17. Influência do pré-tratamento com os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg) sobre a concentração da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) através do método de ELISA. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

Tratamentos (p.o.)	Dose (mg/kg)	Concentração TNF- α (pg/mL)	% Inibição
Veículo	-	0,22 \pm 0,004	-
F ₁₀₋₁₆	2	0,21 \pm 0,006	8,5 *
F ₁₁₋₁₃	2	0,19 \pm 0,004	11,5 **

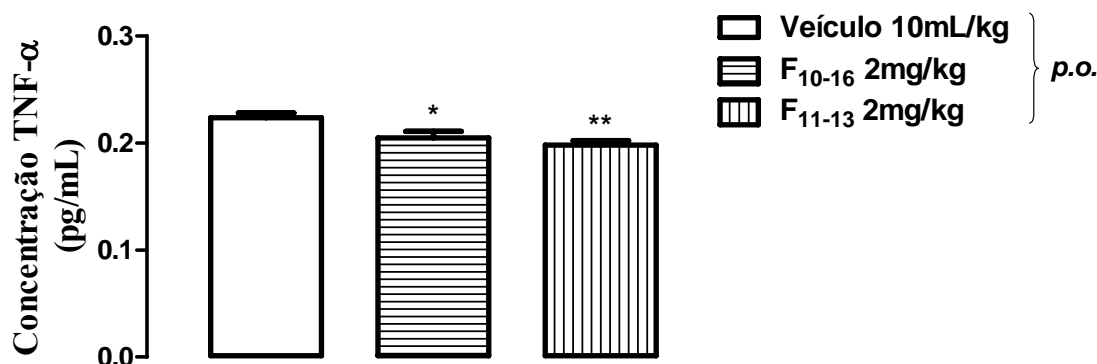


Figura 36. Concentração da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no lavado pleural do grupo de animais pré-tratados com os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (ambos na dose de 2mg/kg). As colunas e barras verticais representam as médias \pm o erro padrão em grupos experimentais de 8 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

6.6.2 Avaliação *in vitro* da atividade enzimática de COX-1 e COX-2

A determinação da atividade das enzimas COX-1 e COX-2 foi realizada através do método de ELISA utilizando-se um kit de imunensaio enzimático (Colometric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit, Cayman Chemical[®]).

Os poços inoculados com as amostras do flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram percentuais de inibição, de maneira dose dependente, da atividade da COX-1 de: 7,0% (0,165nm), 9,0% (0,161nm), 16,5% (0,147nm), 28,4% (0,126nm) e 52,0% (0,186nm) respectivamente, em relação ao grupo controle (100% de atividade da COX-1) (**Tabela 18, Figura 37**).

Tabela 18. Influência dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre a atividade da enzima COX-1, através do método de ELISA.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)		Absorvância média		% de Inibição da atividade de COX-1	
F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃	F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃	F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃
0	0	0,176	0,142	0	0
12,5	6,75	0,165	0,104	7,0	26,5
25,0	12,5	0,161	0,970	9,0	31,7
50,0	25,0	0,147	0,840	16,5	40,8
100,0	100,0	0,126	0,770	28,4	45,8
200,0	200,0	0,086	0,670	52,0	52,8

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima COX-1 permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₀₋₁₆, que foi de 191,1µg/mL (Figura 37).

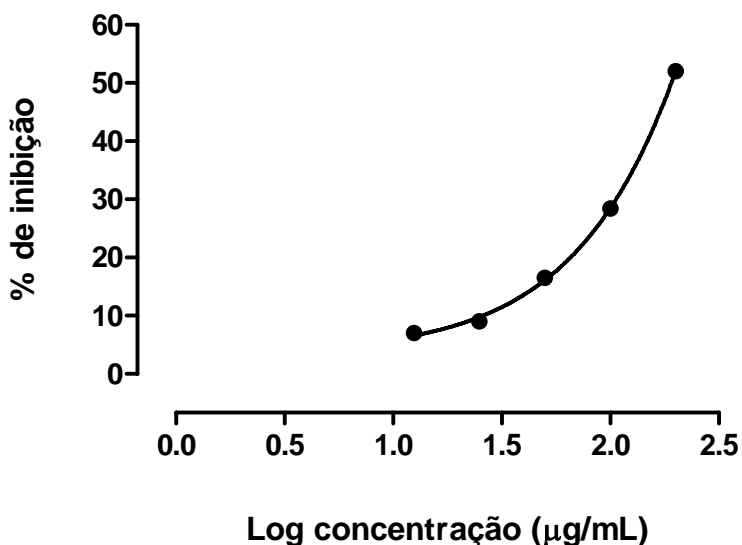


Figura 37. Percentuais de inibição da atividade da enzima COX-1, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100 e 200µg/mL (log concentração de: 1,1; 1,4; 1,7; 2,0 e 2,31µg/mL respectivamente) evidenciando-se a IC₅₀ (191,1 µg/mL).

De maneira semelhante, o flavonóide F₁₁₋₁₃ nas concentrações de 6,75; 12,5; 25 e 200µg/mL apresentou percentuais de inibição da atividade da enzima COX-1 de: 26,5% (0,104nm), 31,7% (0,970nm), 40,8% (0,840nm), 45,8% (0,770nm) e 52,8% (0,670nm) respectivamente, em relação ao grupo controle (100% de atividade da COX-1) (Tabela 18, Figura 38).

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima COX-1 permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₁₋₁₃, que foi de 145,4µg/mL (Figura 38).

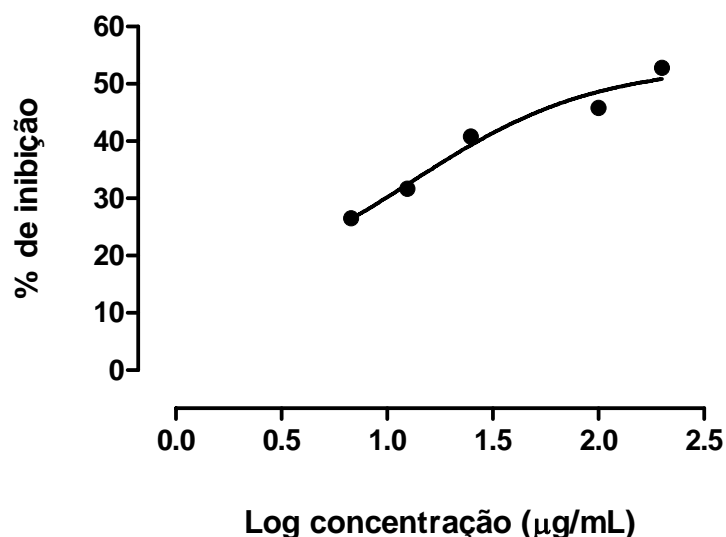


Figura 38. Percentuais de inibição da atividade da enzima COX-1, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₁₋₁₃ nas concentrações de 6,75; 12,5; 25; 50; 100 e 200µg/mL (log concentração de: 0,8; 1,1; 1,4; 2,0 e 2,3µg/mL respectivamente), evidenciando-se a IC₅₀ (145,4µg/mL).

Quanto à determinação da atividade da enzima COX-2, o flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 25; 50; 100 e 200µg/mL apresentou percentuais de inibição da atividade da COX-2 de: 1,6% (0,252nm), 44,9% (0,141nm), 71,5% (0,073nm) e 74,6% (0,065nm) respectivamente, em relação ao grupo controle (100% de atividade da COX-2) (Tabela 19, Figura 39).

Tabela 19. Influência dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre a atividade da enzima COX-2, através do método de ELISA.

Concentração (µg/mL)		Absorvância média		% de Inibição da atividade de COX-2	
F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃	F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃	F ₁₀₋₁₆	F ₁₁₋₁₃
0	0	0,256	0,295	0	0
25,0	25,0	0,252	0,258	1,6	12,6
50,0	50,0	0,141	0,248	44,9	15,9
100,0	100,0	0,073	0,235	71,5	20,3
200,0	200,0	0,065	0,198	74,6	32,9

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima COX-2 permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₀₋₁₆, que foi de 56,1µg/mL (Figura 39).

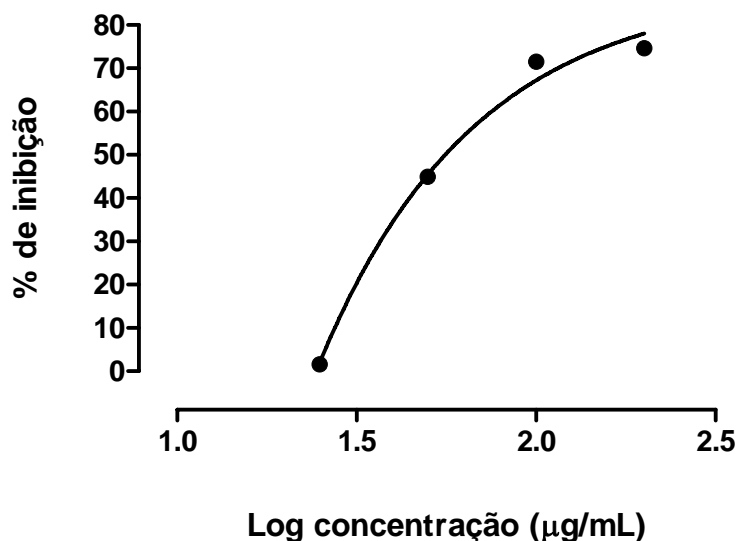


Figura 39. Percentuais de inibição da atividade da enzima COX-2, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 25; 50; 100 e 200µg/mL (log concentração de: 1,4; 1,7; 2,0 e 2,3µg/mL respectivamente), evidenciando-se a IC₅₀ (56,1 µg/mL).

De maneira semelhante, o flavonóide F₁₁₋₁₃ nas concentrações de 25; 50; 100 e 200µg/mL apresentou percentuais de inibição da atividade da enzima COX-2 de: 12,6% (0,295nm), 15,9% (0,248nm), 20,3% (0,235nm) e 32,9% (0,198nm) respectivamente, em relação ao grupo controle (100% de atividade da COX-2) (**Tabela 20, Figura 40**).

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima COX-2 permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₁₋₁₃, que foi de 351,6µg/mL (**Figura 40**).

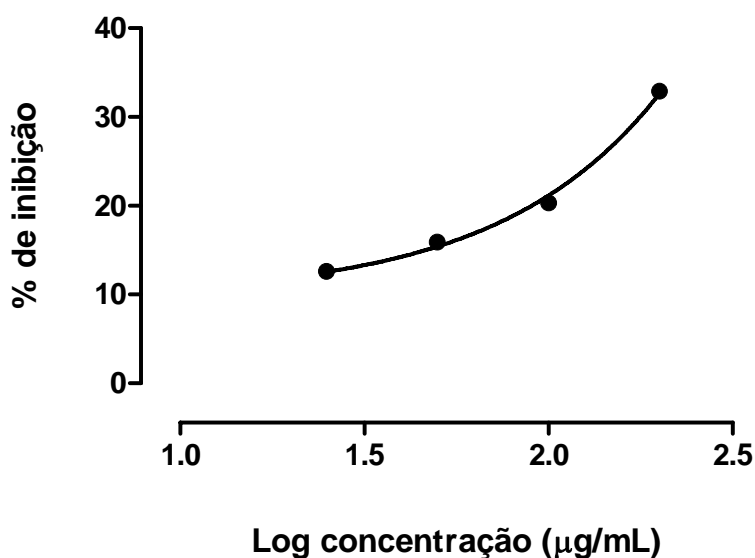


Figura 40. Percentuais de inibição da atividade da enzima COX-2, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 25; 50; 100 e 200µg/mL (log concentração de: 1,4; 1,7; 2,0 e 2,3µg/mL respectivamente), evidenciando-se a IC₅₀ (351,6µg/mL).

De acordo com os resultados obtidos para a COX-1 e COX-2, foi possível determinar a relação de preferência de atividade dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ sobre estas enzimas. Assim, o F₁₀₋₁₆ apresentou uma relação COX-1/COX-2 no valor de 3,4, mostrando possuir uma maior preferência por inibir a COX-2. Já o F₁₁₋₁₃ apresentou uma relação COX-2/COX-1 no valor de 2,4, mostrando possuir uma maior preferência por inibir a COX-1.

6.6.3 Ensaio enzimático da fosfolipase A₂

A inibição da atividade da PLA₂ pela ação dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ foi avaliada através da mensuração dos halos formados ao redor de cada perfuração na placa de Petri, com posterior cálculo da área destes halos (mm²).

O F₁₀₋₁₆, nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1,0mg/mL, foi capaz de reduzir a área do halo em 10,04% (292,6 ± 11,7mm²), 10,05% (294,7 ± 6,8mm²) e 16,7% (272,8 ± 8,4mm²) respectivamente em relação ao grupo veículo (327,6 ± 3,6mm²) (Tabela 20, Figura 41).

Tabela 20. Influência do flavonóide F₁₀₋₁₆ nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0mg/mL sobre a atividade da enzima PLA₂, através da hidrólise de fosfolípido em placas de agarose.

Inoculações	Concentração (mg/mL)	Área do halo (mm ²)	% Inibição
Veículo	-	327,6 ± 3,6	-
F ₁₀₋₁₆	0,1	292,6 ± 11,7	10,04 *
F ₁₀₋₁₆	0,3	294,7 ± 6,8	10,05 *
F ₁₀₋₁₆	1,0	272,8 ± 8,4	16,7 **

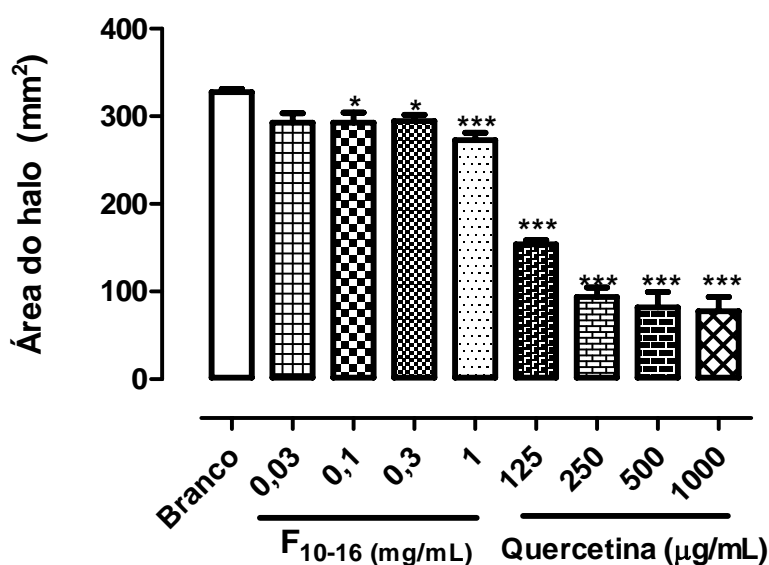


Figura 41. Inibição da atividade da enzima PLA₂, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 0,1; 0,3 e 1mg/mL através do método da hidrólise de fosfolípido em placas de agarose. **p*<0,05 e ****p*<0,001

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima PLA₂ permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₀₋₁₆, que foi de 8,5mg/mL (Figura 42).

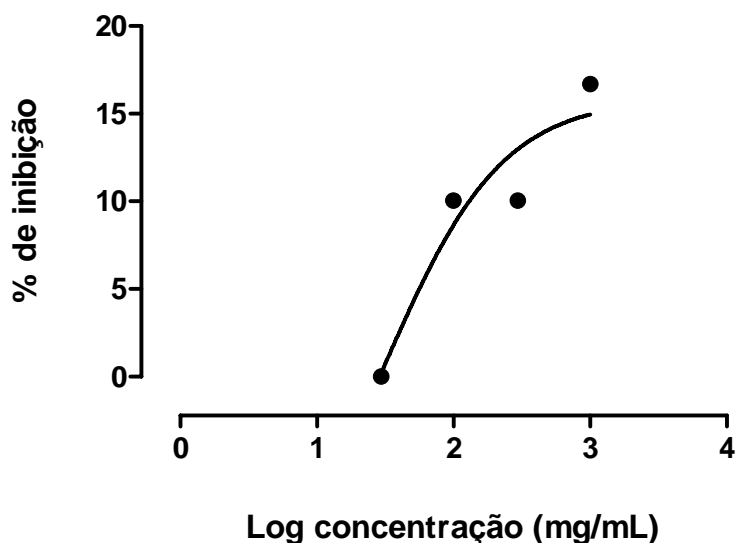


Figura 42. Percentuais de inibição da atividade da enzima PLA₂, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₀₋₁₆ nas concentrações de 0,3; 0,1 e 1,0mg/mL.

O F₁₁₋₁₃, nas concentrações de 0,5 e 1,0mg/mL, foi capaz de reduzir a área do halo em 22,9% ($95,7 \pm 3,4\text{mm}^2$) e 34,6% ($80,9 \pm 9,1\text{mm}^2$) respectivamente em relação ao grupo veículo ($124,2 \pm 7,3\text{mm}^2$) (Tabela 21, Figura 43).

Tabela 21. Influência do flavonóide F₁₁₋₁₃ nas doses de 0,5 e 1,0mg/mL sobre a atividade da enzima PLA₂, através da hidrólise de fosfolipídio em placas de agarose.

Inoculações	Concentração (mg/mL)	Área do halo (mm ²)	% Inibição
Veículo	-	$124,2 \pm 7,3$	-
F ₁₁₋₁₃	0,5	$95,7 \pm 3,4$	22,9 *
F ₁₁₋₁₃	1,0	$80,9 \pm 9,1$	34,6 **

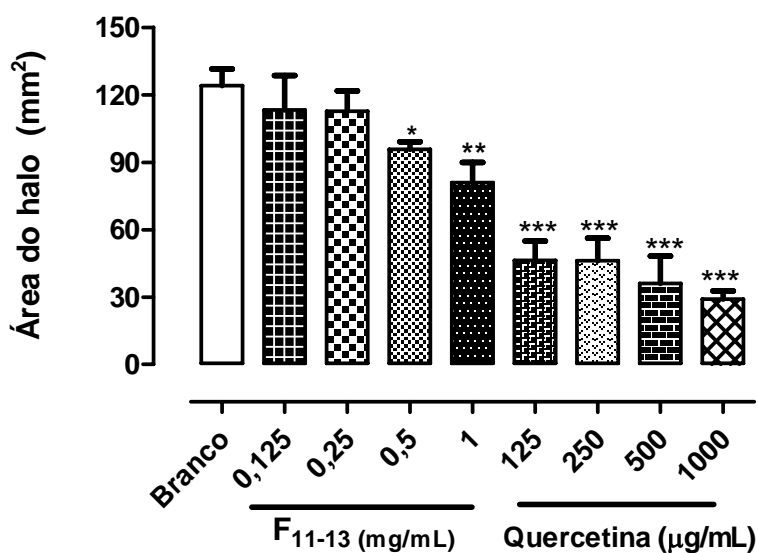


Figura 43. Inibição da atividade da enzima PLA₂, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₁₋₁₃ nas concentrações de 0,5 e 1,0mg/mL.

A obtenção desta relação dose x efeito inibitória pela avaliação da porcentagem de inibição da atividade da enzima PLA₂ permitiu, por interpolações, o cálculo da concentração inibitória 50% (IC₅₀) para o composto F₁₁₋₁₃, que foi de 1,52mg/mL (Figura 44).

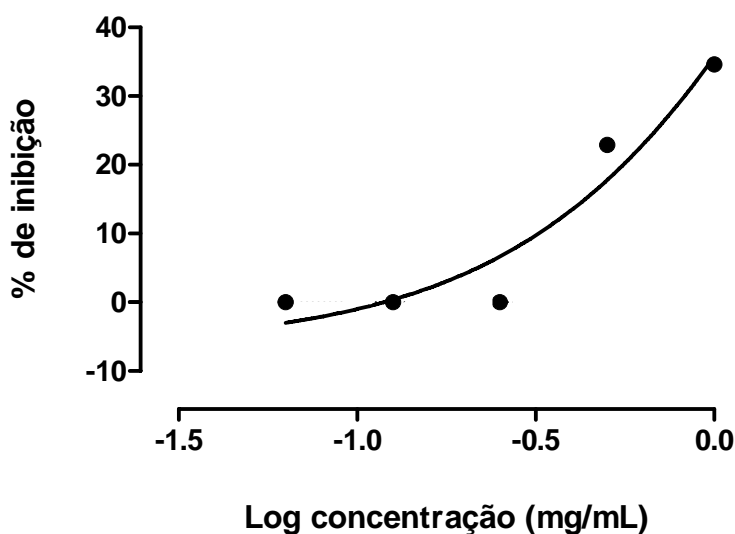


Figura 44. Percentuais de inibição da atividade da enzima PLA₂, de maneira dose dependente, pelo flavonóide F₁₁₋₁₃ nas concentrações de 0,5 e 1,0mg/mL.

7 DISCUSSÃO

O Brasil possui cerca de 22% das plantas superiores existentes no planeta (ELIZABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996) e cerca de 20% da nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis, com o restante encontrando nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1995). Numa visão mundial, 70 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem parcial ou totalmente de medicamentos à base de plantas (WIJESEKERA, 1991). Existe um crescente interesse pela fitomedicina, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de inúmeras doenças, cujas abordagens tradicionais geralmente apresentam uma série de efeitos colaterais e muitas vezes aliviam apenas parcialmente os sintomas sem tratar a doença (ALICE et al., 1995).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fitofármacos (substâncias ativas isoladas), bem como de adjuvantes (produtos utilizados na formulação de medicamentos) ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

Geralmente, a escolha de uma planta medicinal é feita através de uma abordagem etnofarmacológica. Neste sentido, deve-se obter o máximo de informações sobre estudos progressos da planta em questão, uma vez que muitas plantas medicinais são investigadas apenas parcialmente, validando, portanto, o interesse em novas investigações científicas (MACIEL et al., 2002b).

Entre as várias espécies utilizadas pela população estão as plantas do gênero *Cleome*, que consta de 150 espécies formadas por plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas, sendo 28 destas nativas e amplamente distribuídas, preferencialmente em áreas abertas, dentre essas está a *Cleome spinosa* Jacq., popularmente conhecida como mussambê. As folhas e raízes de *C. spinosa* apresentam inúmeras utilizações na terapêutica tradicional, com algumas voltadas para doenças inflamatórias (COLLINS et al., 2004).

Em estudos anteriores (LEAL, 2008), a *C. spinosa* havia passado apenas por investigações fitoquímicas, e no presente estudo foi realizado uma abordagem farmacológica como forma de interligação entre a etnobotânica, química e farmacologia, direcionando para a busca de resultados que pudessem justificar o uso desta planta como medicinal, bem como a identificação de princípios ativos.

A partir do material vegetal coletado das partes aéreas desta planta, foi feita a extração via percolação em metanol e água, que é um processo de extração por solvente preferencialmente utilizado, pois tem apresentado menor risco de reações químicas, na formação de artefatos decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas (MACIEL et al., 2002b), obtendo-se o extrato metanólico da *C. spinosa* (EMCS).

Na busca de compostos ativos e considerando que as plantas e seus extratos podem conter inúmeros constituintes, podendo apresentar muitas vezes efeitos sinérgicos (MACIEL et al., 2002b). A partir do EMCS e através de processos como a cromatografia em coluna filtrante de sílica gel e a cromatografia em camada delgada de sílica, foram isolados dois flavonóides: o F₁₀₋₁₆ e o F₁₁₋₁₃.

A obtenção e a identificação desses compostos flavonóides tornou a investigação farmacológica muito promissora, pois esse grupo de substâncias tem recebido muita

atenção nos últimos anos devido aos vários efeitos biológicos observados, com possíveis indicações terapêuticas. Dentre as classes de flavonóides mais amplamente distribuídos na natureza encontram-se as flavanonas, flavonas e flavonóis (MACIEL, 1997) (**Figura 45**) e no caso, o composto F₁₀₋₁₆ pertence à classe das flavonas e o F₁₁₋₁₃ à classe das flavanonas.

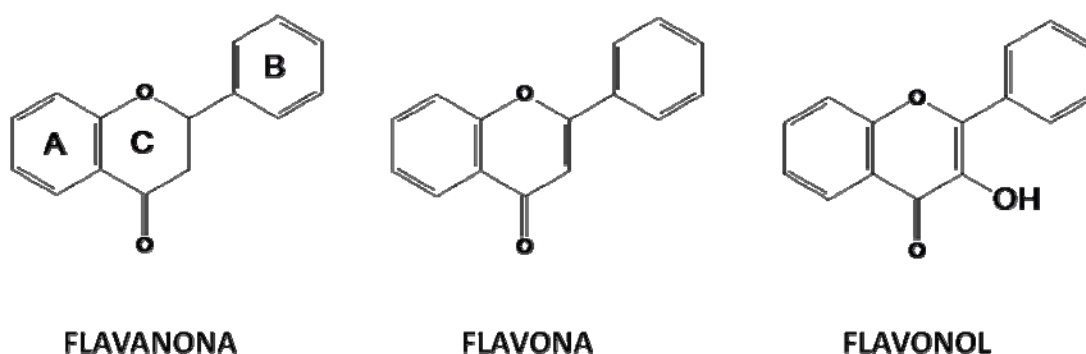


Figura 45. Flavonóides mais amplamente distribuídos na natureza.

Considerando que popularmente, alterações de origem inflamatória tem sido descritas como alvo para o uso terapêutico da *C. spinosa*, o presente estudo investigou as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato metanólico desta espécie vegetal e seus flavonóides, uma vez que, na maioria das situações, os mecanismos que envolvem a nocicepção podem estar relacionados com o processo inflamatório (LEVINE; REICHLING, 1999).

Para avaliar a possível atividade antinociceptiva do EMCS e de seus flavonóides (F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃), foi realizado o teste da formalina em camundongos, um modelo de nocicepção válido e confiável, sensível a várias classes de drogas com propriedades analgésicas. O estímulo nócico consiste na injeção intraplantar de formalina tendo como resposta a reatividade de morder, sacudir ou lambe a pata injetada (DUBUISSON; DENNIS, 1977) sendo avaliados, em segundos, dois períodos distintos de nocicepção: uma fase inicial (dor neurogênica), que corresponde aos primeiros 5 minutos de reatividade imediatamente após o estímulo, e uma fase tardia (dor inflamatória), compreendida entre 15 e 30 minutos após a injeção da formalina.

A administração oral do EMCS (1g/kg) inibiu a 1ª fase do teste, reduzindo em 60,8% o tempo de reatividade dos animais, mantendo esta antinocicepção na segunda fase do teste, com redução de 81,5% da reatividade. Esse efeito que pode ser típico de uma ação antinociceptiva em nível de sistema nervoso central, como demonstrada pela morfina (SHIBATA et al., 1989) não excluiu o envolvimento adicional de mecanismos anti-inflamatórios presentes no EMCS, que poderiam contribuir com a redução da segunda fase de nocicepção.

A dor é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual (DRAY, 1997). O processo inflamatório resulta da liberação de vários mediadores, alguns deles podendo ativar ou sensibilizar os nociceptores locais das fibras aferentes periféricas (C e A δ), contribuindo em maior parte para o desenvolvimento da dor de origem inflamatória, bem como aumento e/ou expressão de neurotransmissores, enzimas, canais iônicos e receptores (ALEY; LEVINE, 1999; DRAY, 1997; BESSON; DICKENSON, 1997; COUTAUX et al., 2005).

De uma maneira geral, os modelos de nocicepção empregados envolvem diferentes mecanismos da dor, tais como o sistema simpático com liberação de aminas bioativas, os metabólitos da via do ácido araquidônico (DUARTE et al., 1992) e o sistema opióide (COLLIER et al., 1968).

Hunskar e Hole (1987) demonstraram que fármacos da classe dos opióides, como a morfina e a codeína, possuem atividade analgésica central e por este motivo apresentam atividade antinociceptiva em ambas as fases do teste da formalina. Por outro lado, drogas anti-inflamatórias não esteroidais, como a indometacina e o naproxeno, bem como as esteroidais, como a dexametasona e a hidrocortisona, inibem apenas a segunda fase do teste. Portanto, as duas fases do teste da formalina possuem mecanismos nociceptivos distintos, no qual a ocorrência da primeira fase se deve a efeitos diretamente sobre os nociceptores, uma vez que ocorre principalmente a liberação de mediadores como serotonina, substância P, cininas, histamina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (GONÇALVES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008), não havendo papel importante das prostaglandinas neste momento. A segunda fase caracteriza-se por uma resposta inflamatória devido à síntese e liberação de citocinas, eicosanóides, cininas, glutamato e óxido nítrico (CHICHORRO et al., 2004; TASSORELLI et al., 2006), sendo a dor inflamatória gerada por estes mediadores potencialmente inibida por drogas anti-inflamatórias, sejam elas esteroidais ou não.

Por outro lado, ainda no teste da formalina, o pré-tratamento de camundongos com os flavonóides F₁₀₋₁₆ ou F₁₁₋₁₃ (ambos 2mg/kg, *p.o.*) foi capaz de reduzir o tempo de reatividade dos animais apenas na segunda fase do teste (51,4 e 38,7% respectivamente), de maneira semelhante à indometacina. Este resultado sugere que estes compostos possuam propriedades anti-inflamatórias, e o fato do EMCS ter inibido também a primeira fase de nocicepção cria o indicativo da existência de diferentes princípios e mecanismos envolvidos com a antinocicepção do extrato.

Baseado na efetividade antinociceptiva observada no teste da formalina, foi investigada a influência do pré-tratamento de ratos com o EMCS na dor incisional. Para isto, após a incisão plantar foram feitas avaliações da hiperalgesia térmica pelo método de Hargreaves e da alodinia mecânica pelo método de *von Frey*.

O pré-tratamento oral com o EMCS (1g/kg.) promoveu o aumento na latência ao estímulo térmico no membro posterior incisado, produzindo reversão da hiperalgesia a partir da terceira hora após a administração do extrato, quando comparado ao grupo controle incisado, atingindo reversão máxima de 58,2% às 12h pós-tratamento.

Efeito semelhante foi observado no teste de *von Frey*, quando a partir da primeira hora após o tratamento com o EMCS promoveu reversão progressiva da alodinia mecânica até a última etapa do experimento, atingindo reversão máxima de 38,4% às 24h pós-tratamento.

A liberação de mediadores em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva (SYRIÁTOWICZ et al., 1999; VANEGAS, 2004), levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo também chamado de hiperalgesia (TJOLSEN; HOLE 1997; VANEGAS, 2004; SOMMER; KRESS, 2004; COUTAUX et al., 2005; VERRI JR, 2006).

Com o aumento da atividade nas fibras aferentes sensoriais após um dano tecidual, pode haver alterações no processamento espinhal de informações sensoriais (YAKSH; HAMMOND, 1982). Assim, a lesão periférica ou a inflamação podem gerar um estado de facilitação espinhal, em que um estímulo moderado evocará uma descarga profunda nos neurônios nociceptivos do corno posterior, avaliados como uma diminuição nas latências de retirada da pata a um estímulo térmico radiante

(HARGREAVES et al., 1988) ou uma diminuição do limiar para estímulos mecânicos (FERREIRA et al., 1978). Nesse processo de sensibilização em nível periférico e central, os prostanóides são potentes em sensibilizar os agentes envolvidos na modulação da transdução e transmissão da informação nociceptiva, produzindo hipersensibilidade pronunciada para estímulos mecânicos e térmicos na pele (BURIAN; GEISLINGER, 2005).

Nesta avaliação nociceptiva pelos métodos de *Hargreaves* e de *von Frey*, a significativa reversão da hiperalgesia promovida pelo EMCS analisada com os resultados obtidos no teste da formalina reforçam o indicativo de que o extrato da *C. spinosa* apresenta propriedades anti-inflamatórias. Estes resultados demonstraram perfil de inibição da hiperalgesia semelhante a experimentos anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório, cuja efetividade de diversos anti-inflamatórios não esteroidais utilizados na clínica médica veterinária foi comparada (TEIXEIRA, 2010). A efetividade do EMCS neste modelo parece envolver a participação dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, considerando que agentes anti-inflamatórios ao inibirem o processo de síntese de prostaglandinas, desempenham um importante papel na redução dos sinais e sintomas da inflamação, não gerando sensibilização dos nociceptores de fibras aferentes e diminuindo a resposta a estímulos álgicos que resultariam em hiperalgesia.

Considerando que um dos parâmetros que indicam a especificidade de uma atividade farmacológica é a possibilidade da obtenção de relações dose x efeito, utilizando o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos foi avaliada a efetividade antinociceptiva do flavonóide F₁₀₋₁₆. A administração oral desse composto (0,5; 1,0 e 2,0mg/kg) reduziu de forma dose-dependente o número de contorções abdominais (ID₅₀=1,47mg/kg), revelando assim a especificidade da antinocicepção desse flavonóide presente no EMCS.

O teste das contorções abdominais é considerado um modelo de antinocicepção não seletivo, pois o agente flogístico atua induzindo a liberação de mediadores endógenos que estimulam os nociceptores que são sensíveis aos anti-inflamatórios não-esteróides e/ou opióides. Contudo, é um método muito sensível para a investigação de efeitos antinociceptivos e apropriado para avaliar este efeito como forma de triagem (COLLIER et al., 1968). Esse resultado obtido como flavonóide F₁₀₋₁₆ é semelhante aos obtidos em estudos que demonstraram que vários flavonóides, como a rutina e a quercitina, ambos abundantemente presentes na natureza, e a luteolina isolada de *Wedelia paludosa*, que produziram antinocicepção em métodos utilizando o ácido acético como agente nócico indutor (BLOCK et al., 1998a;b). Vale ressaltar que, tanto na dor clínica quanto na dor induzida em modelos experimentais não há, a princípio, um mediador ou uma via (ascendente ou descendente) dominante que contribua para a condução e perpetuação do estímulo nociceptivo. Dependendo do local, tipo e duração do estímulo, ocorre ativação de múltiplos canais sensoriais que irão convergir e interagir com estruturas supraespinhais, promovendo a sensação global de dor (MILLAN, 1999).

Para confirmar o indicativo de atividade anti-inflamatória demonstrada do teste da formalina, tanto do EMCS quanto dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, foi realizado o teste da pleurisia induzida pela carragenina. A pleurisia é uma metodologia que provoca na cavidade pleural reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções e inflamações. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o tecido pleural e subpleural, resultando em ativação de células constitutivas, incluindo as células mesoteliais. Como consequência, observa-se aumento de células inflamatórias na cavidade pleural, causando aumento no número de células no espaço pleural (KROGEL; ANTONY, 1997). Em condições normais, o fluido pleural contém somente um pequeno número de células, raramente excedendo 100 células/ μ L, que consistem

principalmente de linfócitos. Contudo, o acometimento da pleura por certas doenças, conforme observado de maneira semelhante neste método experimental, está associado com a infiltração de células do sistema imune, como neutrófilos, eosinófilos ou linfócitos, aumentando o número das mesmas (KROGEL; ANTONY, 1997).

A inflamação induzida pela carragenina tem sido um modelo útil para a determinação da atividade de anti-inflamatórios administrados pela via oral (ISMAIL et al., 1997) e a pleurisia induzida por carragenina tem sido extensivamente usada para investigar os mecanismos envolvidos na inflamação aguda, bem como no desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias (AMMENDOLA et al., 1975; PASSOS et al., 2006). Este modelo permite a avaliação do efeito de substâncias tanto nos eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório (DE SOUZA et al., 2003; MANTENA et al., 2005; PEREIRA et al., 2006; BENINCÁ et al., 2007). Decorridos 20 minutos da injeção intrapleural, a carragenina já promove dano tecidual nas células pleurais e liberação de substâncias vasoativas. Isto resulta no aumento da permeabilidade vascular e no desenvolvimento de um pequeno edema no tecido subpleural, que é seguido por diapedese de neutrófilos e monócitos para este sítio. A subsequente fagocitose da carragenina pelos neutrófilos resulta em degranulação e liberação de enzimas lisossomais decorrentes do aumento da permeabilidade dos vasos. A síntese e a liberação de prostaglandinas vasoativas completa o desenvolvimento da primeira fase da exsudação pleural (VINEGAR et al., 1982).

Nessa avaliação, o pré-tratamento de camundongos com o EMCS (1g/kg, *p.o.*), foi capaz de reduzir o número de leucócitos migrados para a cavidade pleural em 37,1%, bem como a exsudação protéica (32,1%). De maneira semelhante, os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, ambos administrados pela via oral na dose de 2mg/kg, promoveram inibição da migração leucocitária de 42,7 e 39,0%, respectivamente, reforçando com estes resultados, as propriedades anti-inflamatórias do EMCS e dos dois compostos, podendo estar atuando em uma ou várias das manifestações celulares e vasculares induzidas pela carragenina neste método e justificando a efetividade desses em reduzir a reatividade na segunda fase de nocicepção do teste da formalina.

Atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas têm sido relatadas para vários flavonóides, incluindo flavanonas e chalconas (PELZER et al., 1998). Em modelos de inflamação *in vivo* em ratos, já foi observada significativa atividade nas fases proliferativa e exsudativa da inflamação (HANDA et al., 1992), como por exemplo na demonstração da inibição do edema de pata por carragenina e do edema de orelha provocado pelo óleo de cróton no estudo de Di Carlo e colaboradores (1999). Além destes, utilizando a carragenina como agente flogístico, foi avaliada a capacidade de compostos flavonóides em reduzir a formação do edema, a migração das células de defesa e a formação de mediadores e enzimas pró-inflamatórias (COUTINHO et al., 2009).

Sendo o edema outro sinal precoce da inflamação aguda, e considerando que diversos fármacos anti-inflamatórios são capazes de inibir a formação do edema, foi utilizado o teste do edema de pata induzido por carragenina, visando investigar a atividade anti-edematogênica dos flavonóides obtidos a partir do EMCS da *C. spinosa*.

A formação do edema ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas plasmáticas, dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos, fatores do complemento, substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

O edema devido à injeção intraplantar de carragenina é um evento bifásico. A fase inicial é atribuída à liberação de histamina e serotonina. O pico de formação do edema que ocorre aos 180 minutos, está relacionado à liberação de substâncias da classe das cininas, especialmente a bradicinina. A segunda fase do edema ocorre devido à liberação de prostaglandinas, proteases e enzimas lisossomiais. Esta fase é conhecida por ser mais sensível ao efeito clínicos dos anti-inflamatórios (OLAJIDE et al., 1999).

O pré-tratamento de camundongos com os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ (2 mg/kg, p.o.) inibiu a formação do edema em ambas as fases da inflamação aguda, entre 32,5 e 47,1% para o composto F₁₀₋₁₆, e entre 27,9 e 43,7% para o composto F₁₁₋₁₃, sendo essa atividade anti-edematogênica mais um efeito que evidencia as propriedades anti-inflamatórias destas moléculas.

A partir deste ponto, o presente estudo buscou investigar qual seria o possível mecanismo de ação anti-inflamatório responsável pelas atividades do EMCS e dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ observadas até o presente momento. Em relação à atividade anti-inflamatória, sabe-se que os flavonóides atuam modulando células envolvidas com a inflamação, como por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa - TNF- α e a interleucina 1, modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂ (PLA₂), cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; KIM et al., 2004; MIDDLETON et al., 2000; HAVSTEEN, 2002; CAZAROLLI et al., 2008; BIESALSKI, 2007).

Com isto, foi observado que tanto o EMCS quanto seus os flavonóides, F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃, foram capazes de reduzir a concentração de TNF- α no exsudato pleural (29,4; 8,5 e 11,5% respectivamente), podendo com estes dados explicar, pelo menos em parte, os resultados observados no teste da pleurisia, considerando que uma das funções desta citocina inclui mudanças pró-inflamatórias nas células endoteliais, incluindo a produção de outras citocinas e a expressão de moléculas de adesão. Além disto, o estímulo inflamatório causado pela carragenina em condições fisiológicas, por si só estimula a síntese de TNF- α . Portanto, quando se observa redução desta citocina no exsudato pleural de animais injetados com carragenina, entende-se que o pré-tratamento com o EMCS e com os flavonóides foi eficaz na inibição de parte da cascata inflamatória, impedindo o recrutamento de monócitos/macrófagos que iriam promover a síntese de TNF- α no foco inflamatório. De acordo com Glezer e colaboradores (2000), independente do estímulo para a síntese de TNF- α , existe a participação de espécies reativas de oxigênio e aumento da produção de cálcio intracelular, fatores que ativam o NF κ B, um fator de transcrição que regula a ativação de genes envolvidos, dentre outras funções, com a produção da citocina TNF- α . Sendo os flavonóides, de uma maneira geral, potentes agentes anti-oxidativos (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994), sugere-se que a sua atuação no sítio inflamatório reduz a presença de espécies reativas de oxigênio, reduzindo, portanto, a ativação do fator de transcrição NF κ B, e consequentemente promovendo a redução da concentração de TNF- α no exsudato pleural.

Na regulação da síntese de prostaglandinas, a cicloxigenase é uma enzima que representa um ponto crítico de controle (NARABA et al., 1998), sendo o principal alvo de ação das drogas anti-inflamatórias não esteroideais. Alguns flavonóides, como a quercetina, bloqueiam ambas as vias da cicloxigenase e lipoxigenase em concentrações relativamente altas, enquanto que em baixas concentrações a via da lipoxigenase torna-se alvo primário de sua atividade anti-inflamatória (LANDOLFI et al., 1984). Visto a importância das enzimas cicloxigenases, o presente estudo verificou que ambos os

flavonóides possuem atividade inibitória sobre a COX-1 e COX-2, sendo que o flavonóide F₁₁₋₁₃ parece inibir preferencialmente (2,4 vezes mais) a COX-1, e o F₁₀₋₁₆ tem como alvo preferencial a COX-2 (3,4 vezes mais).

Os agentes eicosanóides podem mediar cada fase da reação inflamatória, sendo o ácido aracídico o maior precursor destes. Três formas de PLA₂ estão envolvidas na liberação de araquidonato das membranas celulares: tipo IV, PLA₂ citoplasmática e PLA₂ do tipo II e V, as quais hidrolisam a ligação éster sn-2 de fosfolipídios. Em seguida, as enzimas cicloxigenases convertem o araquidonato em prostaglandinas e tromboxanos. Outros mediadores derivados de fosfolipídios como leucotrienos e fator de ativação plaquetária também exercem fatores relevantes como mediadores de inflamação (SMITH et al., 2000). A PLA₂ é uma proteína presente na peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, mas também pode ser produzida endogenamente pelo organismo. Suas concentrações tornam-se perceptíveis no soro durante desordens inflamatórias graves, disfunção de múltiplos órgãos, queimaduras, entre outras lesões (COSTA et al., 1999), podendo ser consideradas o componente mais importante dos venenos ofídicos. Estas enzimas, provenientes de veneno de serpente, têm sido largamente empregadas como ferramentas farmacológicas para investigar seu papel em diversos processos fisiopatológicos.

A PLA₂ é o componente principal e responsável pelo desencadeamento dos efeitos farmacológicos ocasionados pelo complexo crotoxina (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). A habilidade para induzir efeitos farmacológicos com alta potência evidencia a importância da PLA₂ na toxicidade dos venenos de serpentes (PONCE-SOTO et al., 2006). Muitos componentes dos venenos de serpentes podem levar a efeitos inflamatórios, entre eles estão as PLA₂ que induz a formação de mediadores químicos diretamente ligado ao processo inflamatório (TEIXEIRA et al., 2003).

O presente estudo verificou, através do ensaio enzimático da hidrólise de fosfolipídio em placas de agarose, que os flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ foram capazes de inibir a formação do halo pela PLA₂, isto é, impediram a degradação dos fosfolipídios de membrana presentes nas placas de agarose, uma vez que possuem gema de ovo em sua composição. De maneira semelhante, o controle positivo quercetina, também um flavonóide, inibiu de maneira concentração dependente a formação do halo nas placas, validando o teste e demonstrando a capacidade desta classe de compostos em promover este tipo de inibição. O flavonóide F₁₁₋₁₃ inibiu de maneira mais expressiva (IC₅₀ = 1,52 mg/mL) a formação do halo do que o F₁₀₋₁₆ (IC₅₀ = 8,5 mg/mL), quando comparado com o grupo controle (branco), mostrando uma afinidade maior pela enzima PLA₂.

Numa visão geral, as atividades que foram observadas no EMCS, repetiram-se quando foram estudados os seus flavonóides, porém, algumas destas foram notadas de maneira menos expressiva, como por exemplo, a capacidade dos compostos em reduzir a concentração da citocina TNF- α no exsudato pleural. Cabe lembrar, que uma análise fitoquímica preliminar foi efetuada por Leal (2008) para o extrato metanólico da *C. spinosa*, sendo detectados metabólitos secundários que foram identificados como diterpenos, catequinas, chalconas, alcalóides e flavonóides como: flavonas, flavonóis, flavanonas e flavononóis. A presença destes metabólitos potencialmente bioativos no EMCS, além dos flavonóides aqui estudados, podem justificar a maior ou menor expressão de determinada atividade no extrato do que nos compostos testados, bem como explicar a antinocicepção do EMCS que também indicou a participação de mecanismos centrais, efeito este característico de compostos alcalóides do grupo da morfina. Através de novos estudos fitoquímicos biomonitorados, estas hipóteses poderão ser confirmadas.

8 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que o extrato metanólico da *Cleome spinosa* possui atividade antinociceptiva, conforme observado nos métodos da formalina, *von Frey* e *Hargreaves*, sendo esta atividade atribuída, pelo menos em parte, à sua efetividade anti-inflamatória, conforme observado no método da pleurisia no qual o extrato promoveu redução da migração leucocitária, do extravasamento protéico e da concentração do TNF- α . Contudo, este mecanismo de antinocicepção pode ainda envolver componentes centrais, conforme observado na primeira fase do método da formalina.

A efetividade dos flavonóides F₁₀₋₁₆ e F₁₁₋₁₃ foi demonstrada na inibição da dor (métodos das contorções abdominais e da formalina) e na redução da inflamação (métodos da pleurisia, edema de pata, concentração de TNF- α , atividade de COX-1 e 2, e atividade da PLA₂), podendo explicar, pelo menos em parte, as atividades do EMCS nos mesmos métodos de inflamação e dor.

Além disto, a preferência do F₁₁₋₁₃ em inibir a COX-1, e do F₁₀₋₁₆ em inibir seletivamente a COX-2, demonstra a especificidade de ação destes compostos, sendo um bom indicativo para o desenvolvimento de novos estudos como os de toxicidade, que caracterizem o papel farmacológico inovador destes flavonóides.

Considerando algumas das indicações populares da *Cleome spinosa* e utilizando metodologias fitoquímicas e farmacológicas apropriadas, este estudo buscou explicar o uso desta espécie em enfermidades que envolvem a ocorrência de dor e inflamação, podendo contribuir para o desenvolvimento de um fitofármaco que represente uma nova alternativa terapêutica dentro da clínica médica veterinária.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL-MOGIB, M. A lupane triterpenoid from *Maerua oblongifolia*. **Photochemistry**. v. 51, p. 445-448. 1999.

AHMED, A.A.; KATTAB, A.M.; BODIGE, S.G.; MAD, Y.; MINTER, D.E.; REINECKE, M.G.; WATSON, W.H.; MABRY, T.J. 15 α -acetoxycycloblynnol A from *Cleome amblyocarpa*. **Journal of Natural Products**. v. 64, n. 1, p. 106-107. 2001.

ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **Journal of Neuroscience**. v. 19, n. 6, p. 2181-2186. 1999.

ALEY, K.O.; MESSING, R.O.; MOCHLY-ROSEN, D.; LEVINE, J.D. Chronic hypersensitivity for inflammatory nociceptor sensitization mediated by the epsilon isozyme of protein kinase C. **Journal of Neuroscience**. v. 20, n. 12, p. 4680-4685. 2000.

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S.; MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. **Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico**. 1995. Canoas: Ulbra.

ALMEIDA, M.Z. **Plantas medicinais**, 2 ed. Salvador: Editora EDUFBA, P.31, 147, 181. 2003.

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

AMMENDOLA, G.; DI ROSA, G.M.; SORRENTINO, L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenin pleurisy. **Agents Actions**. v. 5, p.250-255. 1975.

ANIL, B.R.; CHATTOPADHYAY, SUNIL, K.; SANDEEP, K.; CHOYACHI, K.; YOSHINOBU, K.; HIROSHI, H. Structures of cleomiscosins, coumarinolignoids of *Cleome viscosa* seeds. **Tetrahedron**. v. 41, n. 1, p. 209-214. 1985.

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

BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**. v. 50, p. 76-83. 2006.

BEERS, M.H.; BERKOW, R. **Manual Merck**. Ed. Roca Ltda, 2001.

BELL-KROTOSKI, J. Weinstein monofilament using for determining cutaneous light touch deep pressure sensation. **The Star**. v. 44, n. 2, p. 8-11. 1984.

BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**. n. 1, v. 104, p. 1097-1105. 2007.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life Sciences**. v. 55, p. 969-979. 1994.

BERTON, G.; LOWELL, C.A. Integrin signalling in neutrophils and macrophages. **Cell Signal**. v. 11, p. 621-635. 1999.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v. 353, n. 9164, p.1610-1615. 1999.

BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiology Revision**. v. 67, n. 1, p. 67-186. 1987.

BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, v. 130, p.21-41. 1997.

BIE, B.; PAN, Z. Z. Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. **Molecular Pain**. v. 3, n. 37, p. 1-7. 2007.

BIESALSKI, H. K. Curr. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 10, p. 724-728. 2007.

BLOCK, L.C.; SANTOS, A.R.S.; SOUZA, M.M. et al. Chemical and pharmacological examination of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.61, p. 85-89. 1998a.

BLOCK, L.C.; SCHEIDT, C.; QUINTAÄ, N.L.M.; SANTOS, A.R.S.; CECHINEL-FILHO, V. Phytochemical and pharmacological analysis of different parts of *Wedelia paludosa* DC (Compositae). **Pharmazie**. v. 53, p. 716-718. 1998b

BOELCKE, O.; VIZINIS, A. **Plantas Vasculares de la Argentina, nativas y exóticas**. Ilustraciones Tomo II. Dicotiledóneas-Arquiclamídeas de Casuarináceas a Leguminosas. Hemisferio Sur. Buenos Aires, 1987.

BONICA, J. **The management of pain**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

BOSE, A.; GUPTA, J.K.; DASH, G.K.; GHOSH,T.; SI, S.; PANDA, D.S. Diuretic and antibacterial activity of aqueous extract of *Cleome rutidosperma*. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, n. 2, p. 292-294. 2007.

BOSE, A.; MONDAL, S.; GUPTA, J.K.; DASH, G.K.; GHOST, T.; SI, S. Studies on diuretic and laxative activity of ethanolic and its fractions of *Cleome rutidosperma* aerial parts. **Pharmacognosy Magazine**. v. 2, n. 7, p. 178-182. 2006.

BOTTING, R.M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**. v.31, p.208-219. 2006.

BRAMWELL, D. How many plant species are there? **Plant Talk**. Wiltshire, v. 28, p. 32. 2000.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 10, de 9 de março de 2010*. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**. Lawrence, v. 56, n. 11, p. 317-333. 1998.

BRENNAN, T.J.; VANDERMEULEN, E.; GEBHART, G.F. Characterization of a rat model of incisional pain. **Pain**. v. 64, p. 493– 501. 1996.

BRICKS, L.F.; SILVA, C.A.A. Toxicidade dos anti-inflamatórios não-hormonais. **Pediatria**. v. 27, n. 3, p.181-193. 2005.

BROWNSTEIN, M.J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, v. 90, p. 5391-5393. 1993.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 107, p. 139-154. 2005.

CALIXTO, J.B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência Hoje**. São Paulo, v. 21, p. 123. 1996.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**. v. 55, p. 37. 2003.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR, J.M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. v. 78, Suplemento 1, p. 98-106. 2008.

CALVINO, B.; GRILLO, R.M. Central pain control. **Joint Bone Spine**. v. 73, p. 10-16. 2006.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CARVALHO, M.M.M.J.; LODUCA, A.; PORTONI, A.G.; PIMENTA, C.A.M.; FIGUEIRÓ, J.A.B.; BORGES, L.M.; YENG, L.T.; TEIXEIRA, M.J.; KÓVACS, M.J.; MURTA, S.G.; LORDELLO, S.R.M.; GUIMARÃES, S.S. **Dor - um estudo multidisciplinar**. São Paulo. Summus Editorial, 1999.

CARVALHO, W.A.; CARVALHO, R.D.S.; MEDRADO, V.C.; VIANNA, P.T.G. Biologia molecular dos receptores farmacológicos e seus sistemas efetores de interesse em anestesiologia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 47, s. 2, p. 152-167. 1997.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 8, p. 1429. 2008.

CHAI, Z.; GATTI, S.; TONIATTI, C.; POLI, V.; BARTFAI, T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 β : a study on IL-6 deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**. v. 183, p. 311-316. 1996.

CHAVES, T.P.; DANTAS, I.C.; DANTAS, V.S.; DANTAS, G.D.S. Lambedor: um conhecimento popular em abordagem científica. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 2, n. 1. 2008.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**. v. 141, p. 1175-1184. 2004.

CLARK, T.P. The clinical pharmacology of cyclooxygenase-2-selective and dual inhibitors. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 36, p. 1061-1085. 2006.

COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Brazilian Journal of Pharmacology and Chemotherapy**. v. 32, p. 295-310. 1968.

COLLINS, D.O.; REYNOLDS, W.F.; REESE, P.B. New cembranes from *Cleome spinosa*. **Journal of Natural Products**. v. 67, n. 2, p. 179-183. 2004.

CONTRERA, A. et al. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia**. v. 11, p. 157-60. 1985.

COSTA, P.D. et al. Effects of *Bothrops pirajai* venom on the mouse extensor digitorum longus (EDL) muscle preparation. **Toxicon**. v. 37, n. 8, p. 1143-53. 1999.

COSTA, R. et al. Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**. v. 27, p. 2967-2975. 2006.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**. v. 72, p. 359-371. 2005.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n. 3, p. 241-256. 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**. v. 60, p. 52-60. 1997.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v. 104, n. 3, p. 765-767. 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Brazilian Journal of Pharmacology**. v. 107, n. 3, p. 660-664. 1992.

CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, n. 3, p. 401-407. 2004.

DELAVEAU, P.; KOUDOGOB, B.; POUSSET, J-L. Alcaloïds chez les Capparidaceae. **Phytochemistry**. v. 12, p. 2893-2889. 1973.

DE SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ, A.; SCHUHMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; DE FREITAS, R.A.; BELLA CRUZ, R.C. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BELLÉ BRESOLIN, T.M.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas**: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. 1 ed. Itajaí: UNIVALI, 2003. cap. 3. p 119-131.

Di CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**. v.65, p. 337-353. 1999.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 antagonist. **International Reviews of Immunology**. v. 16, p. 457-499. 1998.

DINARELLO, C.A.; BERNHEIM, H.A.; DUFF, G.W.; LEE, H.V.; NAGABHUSHAN, T.L.; HAMILTON, N.A.; COCEANI, F. Mechanisms of fever induced by recombinant human interferon. **Journal of Clinical Investigation**. n. 74, p. 906-913. 1984.

DINARELLO, C.A.; GELFAND, J.A.; WOLFF, S.M. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v. 269, n. 14, p. 1829-1835. 1993.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Unesp, 1995, 230p.

DRAY, A. Peripheral mediators of pain. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A.; BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, v.130, p.21-41. 1997.

DRIESSEN, B. Pain: from sign to disease. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 6, issue 2, p. 120-125. 2007.

DUARTE, I.D.G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia by vouacapan. **Life Science**. v. 50, p. 891-897. 1992.

DUBNER, R.; BENNET, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annual Review of Neuroscience**. v. 6, p. 381-418. 1983.

DUBNER, R.; KENSHALO, D.R. Jr.; MAIXNER, W.; BUSHNELL, M.C.; OLIVERAS, J.L. The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. **Journal of Neurophysiology**. v. 62, n. 2, p. 450-457. 1989.

DUBOIS, R.N.; ABRAMSON, S.B.; CORFFORD, L.; GUPTA, R.A.; SIOMN, L.S.; VAN de PUTTE, L.B.; LIPSKY, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. **Faseb Journal**. v. 12, p. 1063-1088. 1998.

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

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. **Immunology Today**. Cambridge, v. 18, n. 10, p. 487-492. 1997.

ELIZABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective. **Journal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 51, p. 110-120. 1996.

EL-NAGAR, E.B.; BARTOSIKOVA, L.; ZEMLICKA, M.; SVAJDLENKA, E.; RABISKOVA, M.; STRNADOVA, V.; NECAS, J. Antidiabetic effect of *Cleome droserifolia* aerials parts: lipid peroxidation-induced oxidative stress in diabetic rats. **Acta Veterinaria Brno**. v. 74, n. 3, p. 347-352. 2005.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, p. 69. 2001.

FARQUHAR- SMITH, W.P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**. v. 9, n. 1, p. 3-7. 2007.

FAUCI, A.S.; KASPER, D.L.; BRAUNWALD, E.; HAUSER, S.L.; LONGO, D.L.; JAMESON, J.L.; LOSCALZO, J. **Harrison's principles of internal medicine**, 17th Edition, 2001: <http://www.acesmedicine.com>.

FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES, S.L.M.; QUEIROZ, S.R.R.; NETO, N.E.H.; CORAZZA, R.; FARIAS, R.C. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, S.H.; FERRARI, L.F.; CUNHA, T.M.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; VERRI JR, W.A.; CUNHA, F.Q. **Dor incisional** (Apostila da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto) – 2010. Departamento de Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, Brasil.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**. v. 334, n. 6184, p. 698-700. 1988.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; Bradykinin release of TNF- α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents Actions**. v. 38, special number 7-9. 1993.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral analgesic action of aspirin-like drugs. **European Journal of Pharmacology**. v. 53, p. 39-48. 1978.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M. I- prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. **Prostaglandins**. v. 18, n. 2, p. 179-190. 1979.

FILHO, M.M.M.; RAHAL, S.C. O uso de antiinflamatórios inibidores COX II seletivos na osteoartrite canina. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 3, p. 407-415. 2008.

FITZGERALD, G.A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **New England Journal of Medicine**. v. 345, p. 433-442. 2001.

FOORD, S.M.; BONNER, T.I.; NEUBIG, R.R.; ROSSER, E.M.; PIN, J.P.; DAVENPORT, A.P.; SPEDDING, M.; HARMAR, A. J. XLVI G protein-coupled receptor list. International Union of Pharmacology. **Pharmacology Review**. v. 57, n. 2, p. 279-88. 2005.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. New York, v. 166, p. S4-S8. 2002.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids, **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, p. 1061–1080. 1995.

FORTES-DIAS, C.L.; JANNOTTI, M.L.D.; FRANCO, F.J.L.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terricus*). I. Interaction with PLA₂ from Lachesis muta snake venom. **Toxicon**. v. 37, n. 12, p. 1747-1759. 1999.

FRANCO, G.C.N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P.F.C.; LOPES, L.C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v. 18, n. 1, p. 75-81. 2006.

GIBSON, P.R.; Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF- α the link? **Gut**. London, v. 53, n. 12, p. 1724-1725. 2004.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's - The pharmacological basis of therapeutics**. 12th ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2011.

GLEZER, I.; MARCOURAKIS, T.; AVELLAR, M.C.W.; GORENSTEIN, C.; SCAVONE, C. The roles of transcription factor NF- κ B in the molecular mechanisms of

action of psychoactive drugs. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. São Paulo, v. 22, n. 1, p. 26-30. 2000.

GONÇALVES, J.C.; OLIVEIRA, F.S.; BENEDITO, R.B.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAÚJO, D.A. Antinociceptive activity of (-) Carvone: Evidence of association decrease peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, p. 1017-1020. 2008.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A.E.; JUAREZ, A.O.; PELZER, L.E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Il Fármaco**. v. 56, p. 683-687. 2001.

GURIB-FAKIM, A. Medical plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**. v. 27, n. 1, p. 1-93. 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative In Vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**. v. 26, n. 4, p. 411-413. 1988.

HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**. v. 50, n. 1, p. 163-173. 1972.

HALL, J.C.; SYTSMA, K.J.; ILTIS, H.H. Phylogeny of Capparaceae and Brassicaceae based on chloroplast sequence data. **American Journal of Botany**. v. 89, n. 11, p. 1826-1842. 2002.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. New York, v. 30, n. 12, p. 3864-3874. 1991.

HANDA, S.S.; CHAWLA, A.S.; SHARMA, A.K. Plants with anti-inflammatory activity. **Fitoterapia** LXIII, p. 3-31. 1992.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504. 2000.

HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. **Journal of Clinical Investigation**. v. 29, n. 1, p. 115-140. 1950.

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS, J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**. v. 32, n. 1, p. 77-88. 1988.

HARRIS, R.C.; BREYER, M.D. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. **American Journal of Physiology Renal Physiology**. v. 281, F1-F11. 2001.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology Therapy**. v. 96, p. 67-202. 2002.

HAZEWINKEL, H.A.W.; VAN DEN BROM, W.E.; THEYSE, L.F.H.; POLLMEIER, M.; HANSON, P.D. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis model of arthritis in dogs. **Research in Veterinary Science**. v. 84, p. 74-79. 2008.

HENDON, R.A; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological Role of the two components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 7, p. 1560-1563. 1971.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Journal of Pediatrics**. v. 82, n. 5. 2006.

HOLLMAN, P.C.H.; BATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man, **Biomedical Pharmacotherapy**. v. 51, p. 305–310. 1997.

HONORE, P.; ROGERS, S.D., SCHWEI, M.J.; SALAK-JOHNSON, J.L.; LUGER, N.M.; SABINO, M.C.; CLOHISY, D.R.; MANTYH, P.W. Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons. **Neuroscience**. v. 98, p. 585-598. 2000.

HUANG, K.C. **The pharmacology of Chinese Herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1999. 512p.

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

HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **National Review of Neuroscience**. v. 2, p. 83-91. 2001.

IASP - International Association for the Study of Pain. **IASP Taxonomy**. August 10th, 2011. Available from: <http://www.iasp-pain.org>.

ISMAIL, T.S.; GOPALAKRISHNAN, S.; BEGUM, V.H.; ELANGO, V. Anti-inflammatory activity of *Salacia oblonga* Wall. and *Azima tetracantha* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 56, p. 145-152. 1997.

JENSEN, K.; ANDERSEN, H.O.; OLESEN, J.; LINDBLOM, U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer. **Pain**. v. 25, p.313-323. 1986.

JONES, R. - Nonsteroidal Anti-inflammatory drug prescribing: past, present and future. **American Journal of Medicine**. v. 110, p. 4-7. 2001.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. 2000. São Paulo: Manole.

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

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. Jr. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 366, p. 351-76. 1994.

KALSO, E.; ROSENBERG, P. Modern trends in postoperative pain control. **Annual of Medicine**. v.27, p.211-212. 1995.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. J. **Pharmacological Science**. v.96, p. 229. 2004.

KING, J.N.; DAWSON, J.; ESSER, R.E.; FUJIMOTO, R.; KIMBLE, E.F.; MANIARA, W.; MARSHALL, P.J.; O'BYRNE, L.; QUADROS, E.; TOUTAIN, P.L.; LEE, P. Preclinical pharmacology of rofecoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v. 32, p. 1-17. 2009.

KONG, J.M.; GOH, N.K.; CHIA, L.S.; CHIA, T.F. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. **Acta Pharmacology Sinica**. Beijing, v. 24, n. 1, p. 7-21. 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**. v. 18, p. 412. 1959.

KROGEL, C.; ANTONY, V.B. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. **European Respiratory Journal**. v. 10, p. 2411-2418. 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. **ROBBINS and COTRAN– Pathologic Basis of Disease**, 8th edition, 2010, Elsevier.

KUMMER, C.L.; COELHO, T. C. R. B. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, n. 4, p. 498-512. 2002.

KUSHNER, I. Semantics, Inflammation, Cytokines and Common Sense. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 9, n. 3/4, p. 191-196. 1998.

KVATERNICK, V.; POLLMEIER, M.; FISCHER, J.; HANSON, P.D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics**. v. 30, p. 208-217. 2007.

LAGO, J.H.G.; YOUNG, M.D.M.; REIGADA, J.B.; SOARES, M.G.; ROESLER, B.P.; KATO, M.J. Antifungal derivatives from *Piper mollicomum* and *P. hotzkyanum* (Piperaceae). **Química Nova**. v. 30, n. 5, p. 1222-1224. 2007.

LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure–activity relations, **Biochemistry and Pharmacology**. v. 33, p. 1525–1530. 1984.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **National Review of Immunology**. v. 2, n. 10, p. 787-795. 2002.

LEAL, R.S. **Estudos etnofarmacológicos e fitoquímico das espécies medicinais *Cleome spinosa* Jacq, *Pavonia varians* Moric e *Croton cajucara* Benth.** 2008. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN.

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**. v. 27, p. 479-490. 2004.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R, editor, **Textbook of pain**. 1999. 4 ed., Londres: Churchill Livingstone, p.59-84.

LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Science**. v. 8, p. 601-606. 1969.

LIMA, D.R. Medicamentos: passado, presente e futuro. In: Lima DR, editor. **Manual de Farmacologia Clínica, Terapêutica e Toxicologia**. 1994. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 13.

LIMA, M.R.F. et al. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 105, p. 137-147. 2006.

LÓPEZ- POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. S. **Biochemistry and Pharmacology**. v. 76, p. 495. 2008.

LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **European Cytokine Network**. v. 13, n. 4, p. 456-461. 2002.

LOWERY, C.L.; HARDMAN, M.P.; MANNING, N.; HALL, R.W.; ANAND, K.J. Neurodevelopmental changes in fetal pain. **Seminars in Perinatology**. v. 31, n. 5, p. 275-282. 2007.

MACIEL, M.A.M. ***Croton cajucara*: Uma escolha etnobotânica**. 1997. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; MARTINS, J.R.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A.; LAPPA, A.J.; VANDERLINDE, F.A. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. Recent Progress in Medicinal Plants – **Phytochemistry and Pharmacology**. v. 8, p. 502-517. 2002a.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V.F.; ECHEVARRIA, A.; GRYNBERG, N.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002b.

MANS, D.R.A.; ROCHA, A.B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist Durham**, v. 5, n. 3, p. 185-198. 2000.

MANTENA, S.K.; MUTALIK, S.; SRINIVASA, H.; SUBRAMANIAN, G.S.; PRABHAKAR, K.R.; REDDY, K.R.; SRINIVASAN, K.K.; UNNIKRIISHNAN, M.K. Antiallergic, antipyretic, hypoglycemic and hepatoprotective effects of aqueous extract of *Coronopus didymus* Linn. **Biology and Pharmacology Bulletin**. [S.l], v. 28, n. 3, p. 468-472. 2005.

MATTOS, O. N. **Saint-Hilaire**. São Paulo: Secretaria da Cultura, Divisão do Arquivo do Estado, 1980.

MATHEWS, K.A.; DOHERTY, T.; DYSON, D.H.; WILCOCK, B.; VALLIANT, A. Nephrotoxicity in dogs associated with methoxyflurane anesthesia and flunixin meglumine analgesia. **The Canadian Veterinary Journal**. v. 31, p. 766-771. 1990.

McLEAN, W.F.H.; BLUNDEN, G.; JEWERS, K. Quaternary ammonium compounds in few Capparaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 24, n. 5, p. 427-434. 1996.

McMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurons in pain. **Pain**. v. 43, n. 3, p. 269-272. 1990.

MELZACK, R.; WALL, P.D. Pain mechanisms: A new theory. In: **Science**, 1965. v. 150, p. 971-979.

MELZACK, R.; LOESER, J. D. Pain: an overview. **Pain**. v. 353, p. 1607-1609. 1999.

MENSE, S. Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. **Brain research**. v. 225, p. 95-105, 1981.

MERSKEY, H. Terms and taxonomy: paper tools at the cutting edge of study. In: Merskey H., Loeser, J.D., Dubner, R. **The paths of pain**. 1975–2005. Seattle: IASP Press., p. 329–337, 2005.

MESQUITA, L.A.F. **Estudo da cicatrização cutânea causada pelo laser de CO₂ ultrapulsado em retalho dorsal de ratos**. 2002 [Dissertação- Mestrado] Curitiba: Faculdade Evangélica do Paraná.

METHE, H.; ZIMMER, E.; GRIMM, C.; NABAUER, M.; KOGLIN, J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. **Transplantation**. Baltimore, v. 78, n. 9, p. 1324-1331. 2004.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**. v. 52, p. 673. 2000.

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

MIRANDA, L.T.G.S. **Uso da Tintura de Arnica em Feridas Cutâneas Abertas em Ratos**. 2001. [Dissertação-Mestrado]. São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. Universidade Federal de São Paulo.

MIYAZAWA, M.; KINOSHITA, H.; OJUNO, Y. Antimutagenic activity of sakuranetin from *Prunus jamasakura*. **Journal of Food Science**. v. 68, n. 1, p. 52-56. 2003.

MOINICHE, S.; DAHL, J.B.; ERICHSEN, C.J. et al. Time course of subjective pain ratings, and wound and leg tenderness after hysterectomy. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**. v. 41, p.785-789. 1997.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**. v. 84, p. 41-47. 1998.

MOTHANA, R.A.A.; ABDO, S.A.A.; HASSON, S.; ALTHAWAB, F.M.N.; ALAGHBAR, S.A.Z.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. **Oxford Journal**, eCAM Advance. Disponível em <http://ecam.oxfordjournals.org-papbyrecent.dtl>. Acesso em: 28 de mai. 2008.

NARABA, H.; MURAKAMI, M.; MATSUMOTO, H.; SHIMBARA, S.; UENO, A.; KUDO, I.; OH-ISHI, S. Segregated coupling of phospholipases A2, cyclooxygenases, and terminal prostanoid synthases in different phases of prostanoid biosynthesis in rat peritoneal macrophages, **Journal of Immunology**. v. 160, p. 2974-2982. 1998.

NASSAR, I.; GAMAL-ELDEEN, A.M. Potential antioxidant activity of flavonoids from *Hypericum triquetrifolium* Turra, and *Cleome droserifolia* (Forssk) Del. **Bulletin of the Faculty of Pharmacy**. v. 41, n. 2, p. 107-115. 2003.

NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C. **Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. 2001. New York: Macgraw-Hill.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461. 2007.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 74, p. 418. 2001.

OLAJIDE, O.; MAKINDE, J.M.; AWE, S.O. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 66, p. 113-117. 1999.

OLIVEIRA, A.B. **Espectrofotometria no controle de qualidade de fitoterápicos da *Schinus terebinthifolius raddi*: uso de marcadores**. 2001. [Dissertação -Mestrado]. São Luis: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão.

OLIVEIRA, F.S.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 31, p. 588-591. 2008.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **A Estratégia da OMS Sobre Medicina Tradicional 2002-2005 /Organização Mundial de Saúde** – Brasília: Organização Pan-Americana de Saúde, 2002.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E. A.; MOLDAWER, L.L. Anti TNF- α therapies: the next generation. **Natural Reviews Drug Discovery**. London, v. 2, p. 736-746. 2003.

PAPICH, M.G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 38, p. 1243-1266. 2008.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of ethnopharmacology**. p. 1-11. 2006.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Il Fármaco**. v. 53, p. 421. 1998.

PEREIRA, D.A.; BRITO, A.C.; AMARAL, C.L.F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do mussambé (*Cleome spinosa* Jacq) com vistas ao melhoramento genético. **Biotemas**. v. 20, n. 4, p. 27-34. 2007.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRODE, T.S. Antiinflammatory effects of *Tacrolimus* in a mouse model of pleurisy. **Transplant Immunology**. n. 1, v. 16, p. 105-111. 2006.

POGATZKI, E.M.; GEBHART, G.F.; BRENNAN, T.J. Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. **Journal of Neurophysiology**. v. 87, p. 721-731. 2002.

PONCE-SOTO, L.A.; LOMONTE, B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Biological and Structural Characterization of Crotoxin and New Isoform of Crotoxin B PLA2 (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* Snake Venom. **The Protein Journal**. v. 26, n. 4. 2006.

PORTER, D. G. Ethical scores for animal experiments. **Nature**. v. 356, n. 6365, p.101-102. 1992.

RAMACHANDRAN, N.A.G. Cleosandrin, a novel 7-phenoxy coumarin from the seeds of *Cleome isosandra*. **Indian Journal of Chemistry**. v. 17B, n. 5, p. 438-440. 1979.

RAMANA, K.V.; TAMMALI, R.; REDDY, A.B.M.; BHATNAGAR, A.; SRIVASTAVA, S.K. Aldose Reductase-Regulated Tumor Necrosis Factor- α Production Is Essential for High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth. **Endocrinology**. v. 148, n. 9, p. 4371–4384. 2007.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociceptive peripheral neurons. **British Medical Bulletin**. v. 47, n. 3, p. 534-548. 1991.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 2007. 6^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. Elmsford, v. 39, p. 603-613. 2001.

RATHER, L.J. Disturbance of function (*functio laesa*): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galento the four cardinal signs of Celsus. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**. v. 47, n. 3. p. 303-322. 1971.

RENISUS – **Ministério da Saúde**. Fevereiro de 2009.

REXED, B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. **Journal Comparative Neurology**. v. 96, n. 3, p. 414-495. 1952.

RIBEIRO, J.E.L.S. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta da terra-firme na Amazônia Central**. 1999. Manaus: INPA, Ministério do Meio Ambiente, Brasil, 799p.

RICHMOND, C.E.; BROMLEY, L.M.; WOOLF, C.J. Preoperative morphine pre-empts postoperative pain. **Lancet**. v. 42, p. 73–75. 1993.

RODMAN, J. E.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; SYTSMA, K. J.; KAROL, K. G. Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. **American Journal of Botany**. v. 85, p. 997–1006. 1998.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunologia**. 5 ed. São Paulo: Manole, 1999. 423p.

ROTELLI, A.E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A.O.; ROCHA, N.E. de L.A., PELZER, L.E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**. v. 48, p. 601-606. 2003.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**. v. 96, n. 1-2, p. 89-97. 2002.

SALEH, T. S. F, CALIXTO, J. B, MEDEIROS, Y. S. Effects of anti-inflammatory drugs upon nitrate and myeloperoxidase levels in the mouse pleurisy induced by carrageenan. **Peptides**. v. 20, n. 8, p. 949-956. 1999.

SANTOS, A.L. **Avaliação das ações analgésica e antiinflamatória das frações purificadas de duas espécies comuns de Tanchagem: *Plantago major* L e *Plantago lanceolata* L.** 1998. [Dissertação -Mestrado]. São Paulo.

SANTOS, D.A.; MENEZES, J.E.S.A. **Estudo das atividades citotóxica e antimicrobiana de *Cleome spinosa* espécie nativa do município de Itapipoca.** Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005.

SCHACHNA, L. The anti- TNF revolution in ankylosing spondylitis. **Medical Journal of Austrália**. Sydney, v. 181, n. 10, p. 529-530. 2004.

SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Time course of mechanosensitivity changes in articular afferents during a developing experimental arthritis. **Journal of Neurophysiology**. v. 60, n. 6, p. 2180-2195. 1988.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de Origem Vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2001. cap.15. p 301-332.

SHARAF, M.; EL-ALSARI, M.; SALEH, N.A.M. Flavonoids of four *Cleome* and *Capparis* species. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 25, n. 2, p. 161-166. 1997.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. **Best Practice and Research Clinical Anaesthesiology**. v. 18, n. 3, p. 385-405. 2004.

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

SING, P.D.A.; WEST, M.E. Pharmacological investigations of sticky viscome extract (*Cleome viscosa* L.) in rats, mice and guinea-pigs. **Phytotherapy Research**. v. 5, n. 2, p. 82-84. 1991.

SMITH, W.L.; DEITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. **Annual Review of Biochemistry**. v. 69, p. 145-182. 2000.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. **Biometry: The principles and Practice of Statistics.** New York: W. H. Freeman, 1981. p. 859.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**. v. 361, p. 184-187. 2004.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 2011. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

STEAGALL, P.V.M.; MOUTINHO, F.Q.; MATOVANI, F.B.; PASSARELLI, D.; THOMASSIAN, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. **Research in Veterinary Science**. v. 86, p. 115-120. 2009.

STEIN, C.; SCHAFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nature Medicine**. v. 9, n. 8, p. 1003-1008. 2003.

SUMNER, J. **The natural history of medicinal plants**. Portland: Timber Press. 2000. 235p.

SYRIÁTOWICZ, J.P.; HU, D.; WALKER J.S.; TRACEY, D.J. Hyperalgesia due to nerve injury: role of prostaglandins. **Neuroscience**. v. 94, n. 2, p. 587-594. 1999.

TAIWO, Y.O.; BJERKNES, L.K.; GOETZL, E.J.; LEVINE, J.D. Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. **Neuroscience**. v. 32, n. 3, p. 577-580. 1989.

TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **European Journal Pharmacology**. v. 534, p. 103-107. 2006.

TEIXEIRA, C.F.P.; LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES; CHACUR, E.; CURY, M. Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. v. 42, p. 947-962. 2003.

TEIXEIRA, F.M. **Avaliação comparativa do efeito de fármacos anti-inflamatórios com a acupuntura no modelo de dor pós-incisional em ratos**. 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Departamento de Ciências Fisiológicas.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: **The pharmacology of pain**. BESSON, M. J.; DICKENSON, A. Berlin: Springer-Verlag, p. 21-41. 1997.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annual Review Medicine**. Palo Alto, v. 45, p. 491-503. 1994.

TREDE, R.D.; HANDWERKER, H.O.; BAUMGÄRTNER, U.; MEYER, R.A.; MAGERL, W. Hyperalgesia and allodynia: taxonomy, assessment, and mechanisms. In: Brune, K., Handwerker, H.O. **Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications**. Seattle: IASP Press, p. 1-15, 2004.

TURK, D.C.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain. In: D. C. Turk & R. Melzack (eds) **Handbook of Pain assessment**. 1992. Nova York, Guilford, pp. 3-12.

TVERSKOY, M.; OZ, Y.; ISAKSON, A.; FINGER, J., BRADLEY, E.L.; KISSIN, I. Preemptive effect of fentanyl and ketamine on postoperative pain and wound hyperalgesia. **Anesthesia and Analgesia**. v. 78, p. 205-209. 1994.

TYLER, V.E. Herbal medicine: from the past to the future. **Public Health Nutrition**. Wallingford, v. 3, n. 4A, p. 447-452. 2000.

VACHER, P.J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **Medicina Experimentalis**. v. 11, p. 51-58. 1964.

VANE, J.R.; BAKHLE, Y.S.; BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 38, p. 97-120. 1998.

VANEGAS, H. To the descending pain-control system in rats, inflammation-induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. **Neuroscience Letters**. v. 361, p. 225-228. 2004.

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

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**. Dordrecht, v. 9, p. 323-343. 2000.

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

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p.326-337, 2006.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; VOELKER, F.A. Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. **Federation Proceedings**. v. 41, n. 9, p. 2588-2595. 1982.

VON FREY, M. Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Bandes der Abhandlungen der mathematisch-physischen Classe der Königl. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**. v. 23, p. 175-266. 1896.

WALL, P.D. The laminar organization of dorsal horn and effects of descending impulses. **Journal of Physiology**. v. 188, n. 3, p. 403-423. 1967.

WANG, S.; ZHANG, F.; FENG, Q.; YULIN, L. Synthesis, characterization and antibacterial activity of transition metal complexes with 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 46, n. 4, p. 251-257. 1992.

WATKINS, L.R.; GOEHLER, L.E.; RELTON, J.; BEWER, M.T.; MAIER, S.F. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) hyperalgesia. **Brain Research**. v. 692, n. 1-2, p. 244-250. 1995.

WEIMANN, C.; GORANSSON, U.; PONGPRAYOON-CLEASON, U.; CLEASON, P.; BOHLIN, L.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 54, n. 1, p. 99-104. 2002.

WIJESEKERA, R.O.B. **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 269p.

WILLIAMS, A.C.C. et al. Evaluation of a cognitive behavioural programme for rehabilitating patients with chronic pain. **British Journal of General Practice**. v. 43, p. 513-518. 1993.

WILLIS, W.D.; COGGESHALL, R.E. **Sensory mechanisms of the spinal cord**. 1991. New York: Plenum Press.

WILLOUGHBY, D.A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future of chronic inflammatory disease. **Lancet**. v. 355, p. 646-648. 2000.

WOOLF, C.J.; MANNION, R.J. Neuropathic pain: etiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**. v. 353, p. 1959-1964. 1999.

YAKSH, T.L.; HAMMOND, D.L. Peripheral and central substrates involved in the rostral transmissions of nociceptive information. **Pain**. v. 13, p. 1-85. 1982.

YAMADA, C.S.B. Fitoterapia: sua história e importância. **Revista Racine**, São Paulo, v. 43, p. 50-51. 1998.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**. v. 46, p. 585. 2005.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152. 2001.

ZAHN, P.K.; POGATZKI, E.M.; BRENNAN, T.J. Mechanisms for Pain Caused by Incisions. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**. v. 27, n. 5, p. 514-516. 2002.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta Physiologica Scandinavica Supplement**. v. 554, p. 221-233. 1986.