

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ANÁPOLIS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA,
ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Cochlospermum regium*
(Mart & Schrank) Pilger EM RATOS**

Marcelino Santos Neto

GOIÂNIA
2009

Marcelino Santos Neto

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA,
ANTIINFLAMATÓRIA E ANTIPIRÉTICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *Cochlospermum regium*
(Mart & Schrank) Pilger EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, oferecido numa associação entre a Universidade Católica de Goiás, a Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza

**GOIÂNIA
2009**



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO PROFISSIONAL EM GESTÃO, PESQUISA E
DESENVOLVIMENTO EM TECNOLOGIA FARMACÉUTICA

DEFENDIDA PELO MESTRANDO MARCELINO SANTOS NETO, EM 7 DE AGOSTO
DE 2009 E Aprovado COM A NOTA 10,0 (Dez) PELA BANCA
EXAMINADORA.

1) Dra. Fabiane H. Veiga de Souza/ UEG (Presidente)

Fabiane H. V. de Souza

2) Dr. Gilberto L. Benedito de Aquino/UEG (Membro Interno)

Gilberto L. Benedito de Aquino

3) Dra. Mani Indiana Funez / UNB (Membro Externo)

Mani Indiana Funez

Dedico este estudo à minha família, em especial à minha mãe – *Maria das Graças Viana Santos* – pelos ensinamentos de vida e por ter colaborado efetivamente com minha formação.

À minha noiva *Glaécia Aparecida do Nascimento Pereira*, pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e colaboração, fundamentais nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter me abençoado e me guiado ao longo de toda minha existência.

Às instituições **Universidade Católica de Goiás, Universidade Estadual de Goiás e o Centro Universitário de Anápolis** pela parceria firmada para execução do Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica.

À **Fundação de Medicina Tropical do Tocantins** por ter concedido além das informações sobre o estudo etnofarmacológico realizado em Araguaína-TO, o extrato da planta. Em especial, agradeço aos pesquisadores **Fábio Cruz e Marlene Antunes**.

À **Profa. Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza**, não só pelo incentivo, mas também por todo apoio e orientações realizadas e ainda por ter compartilhado suas experiências profissionais, seus conhecimentos e por ser um exemplo de profissional dedicada e competente.

A toda equipe de **Professores(as) do Programa de Pós-Graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica**, que esteve presente durante a realização do curso, pelo empenho e satisfação em repassarem conhecimentos contribuindo para com a minha formação científica.

À **Secretaria e à Coordenação** do Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica, pela atenção e esmero no atendimento às nossas solicitações.

A **CAPES** pela concessão da ajuda de custo para realização desta pesquisa.

Aos **colegas de turma**, pelo convívio salutar e ajuda mútua no cotidiano. Gostaria de agradecer a todos de **Araguaína, Palmas e Imperatriz**. Quero prestar meus sinceros agradecimentos às amigas de Imperatriz, **Sheila Nunes e Marbenha Brito**, por terem sido “companheiras” durante toda a trajetória.

Registro ainda um especial agradecimento ao inicialmente colega de turma e depois “amigo” **Rotherdan Cruz**, com quem pude contar para o desenvolvimento das atividades de bancada. Sua ajuda foi fundamental.

À **Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza** por ter nos recebido e cedido o Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)/Universidade de São Paulo (USP) para realização dos testes farmacológicos.

À equipe de bolsistas (doutorandos e pós-doutorandos) do Laboratório de Farmacologia da FCFRP/USP, em especial **Alexandre Kanashiro, Andréa Pessini, David Malvar, Juliano Martins e Renes Machado** por terem colaborado em diversos momentos na execução dos testes farmacológicos, além do apoio científico e pessoal.

Aos membros da Comissão Examinadora, pelo aceite e pela atenção a mim dispensada.

Agradeço enfim a todos que fizeram parte deste caminho de crescimento pessoal e profissional. Meu muitíssimo **Obrigado!**

“De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estamos sempre começando; a certeza de que é preciso continuar; a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar; Portanto devemos: fazer da interrupção um caminho novo; da queda um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte e da procura... um encontro”.

Fernando Sabino

RESUMO

A utilização de plantas para prevenção ou tratamento de doenças tem sido realizada pela humanidade desde os tempos mais remotos e transmitida ao longo de gerações. Estudos científicos vêm sendo realizados no sentido de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais. A partir de levantamentos etnofarmacológicos pode-se reduzir o tempo e os gastos na pesquisa e no desenvolvimento de um novo medicamento. Em 2003, Andrade e colaboradores identificaram as plantas com uso medicinal no Estado do Tocantins, pré-selecionadas por meio de dados obtidos pelo Projeto Bosque da Biodiversidade, realizado pela UNITINS/Ministério da Saúde/Ministério do Meio Ambiente e disponibilizado pela FMT/UNITINS. Deste levantamento foi selecionada *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, conhecida vulgarmente como “Algodãozinho-do-campo”, que promove, segundo a população pesquisada, ação antiinflamatória (principal), analgésica e antipirética. Desta forma, o presente estudo objetivou investigar as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética do extrato hidroalcoólico bruto (EHA) da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger em ratos por meio dos testes da formalina, edema de pata induzido por carragenina e febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS). A administração oral do EHA produziu efeito antinociceptivo significativo de forma dose-dependente em relação a ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, sendo, contudo, mais efetivo na primeira fase desse modelo (inibição de 36% e 57% para as doses de 640 e 1280 mg/kg, respectivamente). A atividade antiinflamatória do EHA foi confirmada no modelo de edema de pata induzido por carragenina uma vez que nossos resultados demonstraram que o EHA reduziu de maneira dose-dependente o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina em ratos. As doses de 640 e 1280 mg/kg do extrato inibiram 22,5 % e 36,2 %, respectivamente, a formação do edema três horas após a injeção do estímulo inflamatório. Foi possível verificar ainda que o EHA, na dose de 1280 mg/kg, inibiu a resposta febril induzida pelo LPS. A inibição ocorreu a partir da 2ª hora após a administração de LPS e perdurou durante todo o período de observação, com pico máximo de inibição de 0,7°C entre a 2 h e 3 h. Tais resultados colaboram para a validação científica de seu uso popular, e indicam possibilidades reais para esta planta como fonte de princípio(s) ativo(s), cuja pesquisa aprofundada pode levar à descoberta de uma nova e melhor alternativa terapêutica aos estados patológicos de inflamação, dor e febre. Para tanto é necessária a realização de experimentos adicionais para isolamento e caracterização dos constituintes químicos e, sobretudo, para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades analgésica, antiinflamatória e antipirética, bem como estudos de toxicidade e segurança.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Cochlospermum regium*. Atividade antiinflamatória. Atividade antinociceptiva. Atividade antipirética.

ABSTRACT

The use of plants for prevention or treatment of diseases have been carried out by mankind from earliest times and transmitted over generations. Scientific studies have been conducted to validate the information concerning the popular use of medicinal plants. From surveys ethnopharmacology you can reduce the time and expense in research and development of new drugs. In 2003, Andrade and colleagues identified plants with medicinal use in the state of Tocantins, Brazil, pre-selected by means of data obtained by the Forest Biodiversity Project, conducted by UNITINS / Ministry of Health / Ministry of the Environment and made available by the FMT / UNITINS. From this survey we selected *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, known commonly as “Algodãozinho-do-campo”, which promotes, in the studied population, anti-inflammatory (main), analgesic and antipyretic activity. Thus, this study aimed to investigate the antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activity of a crude hydroalcoholic extract (EHA) of the roots of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger in rats by means of the formalin test, the paw edema induced by carrageenan and fever induced by lipopolysaccharide (LPS). The oral administration of EHA produced significant antinociceptive effect in a dose-dependent for both phases of nociception induced by formalin, and yet more effective in the first phase of this model (inhibition of 36% and 57% for doses of 640 and 1280 mg / kg, respectively). The antiinflammatory activity of EHA was confirmed in the model of paw edema induced by carrageenan since our results showed that the EHA reduced dose-dependent manner of the edema of paw induced by intraplantar administration of carrageenan in rats. The doses of 640 and 1280 mg / kg of extract inhibited 22.5% and 36.2%, respectively, the formation of edema three hours after the injection of inflammatory stimulus. It was possible to verify that the EHA, the dose of 1280 mg / kg, inhibited the febrile response induced by LPS. The inhibition occurred from the 2nd hour after administration of LPS and continued throughout the observation period, with maximum inhibition of 0.7 ° C between 2 h and 3 h. These results contribute to the scientific validation of its use popular, and show real possibilities for this plant as a source of principle (s) active (s), the search depth can lead to the discovery of a new and better therapeutic alternative to the pathological states of inflammation , pain and fever. Thus it is necessary to carry out additional experiments to isolate and characterize the chemical constituents and especially to better clarify the mechanisms of action involved in activities analgesic, antipyretic and antiinflammatory as well as studies of toxicity and safety.

Key words: Medicinal plants. *Cochlospermum regium*. Antiinflammatory activity. Antinociceptive activity. Antipyretic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Fotos de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger	21
Figura 2: Efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina.....	48
Figura 3: Efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina.....	49
Figura 4: Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) nas doses de 160 e 320 mg/kg sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (Cg).....	51
Figura 5: Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) nas doses de 640 e 1280 mg/kg sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (Cg).....	52
Figura 6: Efeito antipirético da indometacina sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> (LPS) em ratos.....	53
Figura 7: Efeito de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> (LPS) em ratos.....	54
Figura 8: Efeito de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de <i>E. coli</i> (LPS) em ratos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ΔT	Variação de temperatura
a.C	Antes de Cristo
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINES	Antiinflamatório não esteroidal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP-1	Proteína ativadora 1
APOHA	Área pré-óptica de hipotálamo anterior
Cg	Carragenina
COBEA	Comitê Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase(s)
CRF	Fator liberador de corticotropina
CSF	Fluído cérebro-espinhal
d. C	Depois de Cristo
DL ₅₀	Dose letal cinquenta por cento
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E.P.M	Erro padrão da media
EHA	Extrato hidroalcoólico de Algodãozinho
ET	Endotelina(s)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	Food and Drug Administration
FMT	Fundação de Medicina Tropical
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
i.cv	Intracerebroventricular
i.p	Intraperitoneal
i.v	Intravenoso
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina(s)
LAT.	Latitude
LONG.	Longitude
LOX	Lipoxigenase(s)
LPS	Lipopolissacarideo

LT	Leucotrieno(s)
M	Molar
MDP	Muramil-dipeptídeo
MS	Ministério da Saúde
N	Número
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NVP	Núcleo paraventricular hipotalâmico
°C	Grau Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P.A	Puro para análise
PAF	Fator de ativação de plaquetas
PGs	Prostaglandina(s)
PGI	Prostaciclina(s)
Ph	Potencial hidrogeniônico
PK(s)	Proteína(s) quinase(s)
S	Sul
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
s.pl	Subplantar
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano(s)
UCG	Universidade Católica de Goiás
UEG	Universidade Estadual de Goiás
USP	Universidade de São Paulo
v.o	Via oral
W	Oeste
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	Ix
LISTA DE ABREVIATURAS	X
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. PLANTAS MEDICINAIS.....	14
1.2. <i>Cochlospermum regium</i> (Mart & Schrank) Pilger	20
1.3. DOR.....	23
1.3.1. Testes de atividade antinociceptiva	25
1.4. INFLAMAÇÃO.....	27
1.4.1. Testes de atividade antiinflamatória	35
1.5. FEBRE	36
1.5.1. Testes de atividade antipirética	40
2. OBJETIVOS	42
2.1. OBJETIVO GERAL.....	42
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. LOCAIS DE TRABALHO.....	43
3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	43
3.3. PREPARA DO PLANTA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO.....	43
3.4. PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	43
3.5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	44
3.6. TRATAMENTOS.....	44
3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EHA.....	45

3.7.1. Teste da formalina	45
3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EHA.....	45
3.8.1. Teste do edema induzido por carragenina	45
3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA DO EHA.....	46
3.9.1. Ensaio de febre induzido por LPS em ratos	46
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DE EHA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA, EM RATOS.....	48
4.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DE EHA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA, EM RATOS.....	51
4.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DO EHA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LPS, EM RATOS.....	53
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de produtos naturais, particularmente da flora, com fins medicinais nasceu com a humanidade. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizada pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005; ANDRADE *et al.*, 2007).

Grande parte da população mundial tem confiança nos métodos tradicionais relativos aos cuidados diários com a saúde. Aproximadamente 25% de todas as prescrições médicas são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados destas. Cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, confiam nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde (GURIB-FAKIM, 2006).

Médicos famosos da Antigüidade, como Hipócrates e Avicena, já faziam uso das plantas medicinais. Em países como a China, essa prática é seguida há muitos séculos. No Brasil, as plantas eram usadas pelos povos indígenas em rituais de cura, da mesma maneira que os povos africanos faziam sua associação com rituais religiosos. A disseminação da fitoterapia teve também auxílio dos povos europeus que aqui chegaram durante o período da colonização, e dos chineses e japoneses, imigrantes do início do século XX (MOTA *et al.*, 2004).

Desde a metade do século passado até hoje, apesar de todos os avanços da medicina moderna, as plantas ainda contribuem significativamente para o tratamento e para a cura das doenças. Fazendo um retrospecto desta época até a atualidade, observa-se que a descoberta e o desenvolvimento de vários medicamentos estão intimamente ligados às plantas, na qual os cientistas passaram a usá-las na extração direta de princípios ativos, utilizando-os na elaboração de derivados químicos semi-sintéticos ou mesmo para síntese total de fármacos (CALIXTO, 2000). Um exemplo clássico é o ácido acetilsalicílico (AAS), analgésico e antiinflamatório reconhecido, obtido a partir do ácido salicílico, um derivado semi-sintético, também obtido de precursores extraídos da casca das espécies

Salix Alba e *Filipendula ulmaria*, conhecidas vulgarmente como salgueiro (MCCURDY; SCULLY, 2005; VANE, 2000).

As primeiras drogas foram as de origem natural, extraídas principalmente de plantas superiores e destinavam-se à terapia de doenças infecciosas. De fato, povos antigos, como os do mediterrâneo, chineses, hindus e maias (séculos antes da era atual), já conheciam o emprego terapêutico de certas plantas e de alguns minerais (KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo dentre outros a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisina, a atropina, escopolamina e o cromolin. Além disso, cerca de 60% a 75% dos medicamentos para tratamento do câncer e de doenças infecciosas que estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais (FARNSWORTH e BINGEL, 1997; CALIXTO, 2001; NEWMAN *et al.*, 2003; BOLDI, 2004).

Segundo relatos, 3.000 anos a.C. já havia o cultivo e uso de algumas plantas medicinais que atualmente são utilizadas com eficácia na medicina popular e por laboratórios farmacêuticos (RODRIGUES & CARVALHO, 2001). Evidencia-se que, já no período Neolítico, utilizavam-se ervas aromáticas em culinária e medicina (BERWICK, 1996), sendo o descobrimento das propriedades curativas das plantas considerado, no início, meramente intuitivo ou, pela observação dos animais quando doentes que buscavam nas ervas a cura para suas afecções (OLIVEIRA & SIQUEIRA, 1994). Desta forma, o uso popular das plantas medicinais foi crescendo de geração a geração e, a partir do desenvolvimento da química orgânica, tornou-se possível isolar os princípios ativos das plantas, obtendo substâncias ativas (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Até o século XIX os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas Farmacopéias da época. Assim, na *Farmacopéia Geral para o Reino e domínios de Portugal* (1794), entre os produtos chamados *simplices* constam 30 produtos de origem mineral, 11 produtos de origem animal e cerca de 400 espécies vegetais. Ou seja, as plantas medicinais e seus extrativos constituíam a maioria dos medicamentos, que naquela época pouco se diferenciavam dos remédios utilizados na medicina popular (SCHENKEL *et al.*, 2000).

Apesar do grande avanço e evolução da medicina a partir da segunda metade do século XX, as plantas ainda apresentam uma grande contribuição para a manutenção da saúde. Cerca de 70% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais para os cuidados primários com a saúde, utilizando recursos da flora nativa no alívio às enfermidades (CALIXTO, 2000; SOUZA & FELFILI, 2006). Entre os principais motivos encontram-se as condições de pobreza e a falta de acesso aos medicamentos, associados à fácil obtenção e tradição do uso de plantas com fins medicinais (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005).

Os vegetais se apresentam como fonte de princípios ativos com ação farmacológica. Merece também destaque o importante papel dos vegetais na nutrição humana e na Saúde Pública, como fornecedores naturais de vitaminas e sais minerais – elementos indispensáveis para a higidez do organismo. Nesse sentido, os vegetais contêm em abundância substâncias fenólicas, terpenóides e outros antioxidantes naturais que, associados ou não com medicamentos, previnem as doenças crônicas do coração e o câncer (WAGNER, 2003).

Di Stasi (1996) cita que, no Brasil, cerca de 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas, a única fonte acessível de recurso terapêutico. Nota-se o crescimento do mercado de fitoterápicos com o uso indiscriminado, baseado na crença da ausência de efeitos indesejáveis, gerando certa preocupação entre os cientistas e profissionais de saúde, que alertam sobre o grande número de plantas medicinais e chás não licenciados vendidos principalmente nas regiões mais pobres do país ou mesmo em grandes centros brasileiros, onde a comercialização de plantas medicinais é feita sem regulamentação em feiras livres e mercados populares (MILLER, 1998; MACIEL., 2002).

As plantas têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários. Estes são conhecidos por atuar de forma direta ou indireta no organismo podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares, por exemplo: interferindo na produção de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios, entre outros); agindo sobre a produção ou ação de segundos mensageiros (como guanosina monofosfato cíclica (GMPc), adenosina monofosfato cíclica (AMPc), proteínas quinases (PKs), etc.), na expressão de fatores de transcrição como proteína

ativadora-1 (AP-1), fator nuclear κ B (NF- κ B), e proto-oncogenes (cjun, c-fos e c-myc); inibindo ou ativando a expressão de células pró-inflamatórias como sintetase do óxido nítrico (NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas (interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , etc.), neuropeptídeos e proteases (CALIXTO *et al*, 2005).

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

A maioria dessas plantas é utilizada com base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (ALICE *et al.*, 1995; TUROLLA & NASCIMENTO, 2006). Muitas vezes, entretanto, as propriedades farmacológicas anunciadas não possuem validação científica por não terem sido investigadas ou comprovadas em testes pré-clínicos e clínicos. Além disso, verifica-se também escasso conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica, ou as possíveis interações que envolvam as inúmeras moléculas presentes no extrato da planta (CALIXTO, 2003).

Todas as cinco regiões Brasileiras são ricas em plantas nativas, com destaque para as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, por suas ricas biodiversidades. O Brasil é reconhecido como um dos países que possui a mais diversificada flora, com grande potencial a ser desvendado na produção de fármacos. Infelizmente, nos tempos atuais, a rica flora e a fauna brasileira têm sido progressivamente destruídas, comprometendo a pesquisa etnofarmacológica nesses últimos 40 anos.

As plantas medicinais utilizadas na conhecida “Medicina Popular Brasileira” têm a sua manipulação realizada de forma artesanal e empírica, sem estudo científico adequado. Tais produtos eram antigamente manipulados por pajés e feiticeiros; hoje em dia ainda pode ser encontrado seu uso por benzedeiros e curandeiros, que preparam as chamadas “garrafadas” em suas próprias casas. São os chás, as infusões, as inalações, os unguentos e os banhos “de assento”, que se constituem como práticas populares, notadamente nas pequenas cidades do Norte, Nordeste e Centro-Oeste Brasileiro.

Embora, no Brasil, a Resolução nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, em vigor a partir daquela data, regularmente o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária, a normatização não é aplicada satisfatoriamente. As plantas medicinais e seus produtos derivados são comercializados de diversas formas, podendo ser adquiridas em farmácias de manipulação, supermercados ou feiras-livres.

Para Calixto (2005) a pesquisa e o desenvolvimento de um novo medicamento a partir de produtos naturais é um processo longo, caro e difícil. Portanto, para reduzir o tempo e os gastos na pesquisa é necessário realizar estudos etnofarmacológicos.

Estudos etnobotânicos de registro de plantas, seus usos e formas terapêuticas por grupos humanos, têm oferecido a base para diversos estudos elementares e aplicados, especialmente no campo da fitoquímica e farmacologia, inclusive como ferramenta para o descobrimento de novas drogas. Neste contexto, insere-se a etnofarmacologia, como um ramo da etnobiologia e da etnobotânica, que trata das práticas médicas, especialmente remédios usados em sistemas tradicionais de medicina (ELIZABTSKY, 1999).

Como estratégia para investigação de fitofármacos, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto às comunidades locais que fazem uso da flora medicinal (pesquisa etnobotânica) com estudos químico/farmacológicos realizados em laboratórios especializados. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à(s) atividade(s) farmacológica(s) e à(s) substância(s) ativa(s) responsável(eis) pelas ação(ões) terapêutica(s) relatada(s) pela população (CORRÊA *et al.*, 2003).

Inúmeros estudos científicos vêm sendo feitos no sentido de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais. Podemos mencionar o atual e intenso interesse que os cientistas, bem como a indústria farmacêutica denotam ao desenvolver pesquisas com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e também aprimorar as descobertas de novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e oriundas de plantas. Verificamos que os segmentos acima citados demonstram preocupação quanto ao desenvolvimento de técnicas de isolamento e identificação, produção e cultivo de drogas (origem vegetal), biogênese de princípios ativos e outros métodos que levam ao melhoramento de seus produtos (GURIB-FAKIM, 2006).

Estes dados justificam o crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive em países de clima tropical, como o Brasil, que apresentam grande biodiversidade. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detém cerca de 22% das plantas do planeta (CALIXTO, 2005).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) visando diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde reforça a importância dos estudos etnofarmacológicos e recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde de cada país que realizem levantamentos regionais das plantas usadas na medicina popular tradicional e a identificação botânica. Além disso, a OMS deseja, principalmente dos países subdesenvolvidos, que estimulem e recomendem o uso daquelas que tiverem comprovada sua eficácia e segurança terapêuticas, desaconselhando o emprego das práticas da medicina popular consideradas inúteis ou prejudiciais e que desenvolvam programas que permitam cultivar e utilizar as plantas selecionadas na forma de preparações dotadas de eficácia, segurança e qualidade (LORENZI & MATOS, 2002).

Andrade *et al* (2003) identificaram as plantas com uso medicinal no Estado do Tocantins, pré-selecionadas por meio de dados secundários, a partir de estudo etnofarmacológico do Projeto Bosque da Biodiversidade UNITINS (Fundação Universidade do Tocantins)/Ministério da Saúde/Ministério do Meio Ambiente, disponibilizado pela Fundação de Medicina Tropical (FMT). Deste levantamento foi selecionada para a realização do presente estudo a planta *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, conhecida vulgarmente como Algodãozinho-do-campo. De acordo com o estudo etnofarmacológico esta planta é utilizada pela população de Araguaína-TO por promover ações antiinflamatória e analgésica. De todas as plantas utilizadas para o tratamento de processos inflamatórios, o Algodãozinho-do-campo foi a mais citada dentre 20 (vinte) plantas e a 15^a em citações para o alívio da dor.

1.2. *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger

Cochlospermum regium (Mart & Schrank) Pilger pertence à família Cochlospermaceae, tem ocorrência em regiões quentes e secas das Américas, África e Austrália. Embora esta espécie tenha sido considerada como exclusivamente brasileira, foi localizada também no Paraguai e Bolívia, nas localidades de Amambay e Santa Cruz (LIMA *et al.*, 1995).

No Brasil, encontramos comumente esta planta nas regiões do cerrado dos estados de São Paulo, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Bahia, Paraná, Pernambuco, Ceará e ainda na Amazônia. Recebe diferentes nomes populares conforme as localidades, tais como “algodão-do-campo”, “algodoeiro-do-campo” (SP, MG e MS), “algodãozinho”, “algodãozinho-do-campo” (MG, MS, MT, GO e TO), “algodão-crava”, algodão-do-mato (PE, CE).

De acordo com Kirizawa (1981), *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (Figura 1) é uma espécie arbustiva com caule nodoso de lenho leve. O sistema subterrâneo é bem desenvolvido, com raiz axial profunda e carnosa e pode atingir mais de 3 metros de comprimento. Suas folhas são verde escuro, opacas, alternas, de pecíolos longos, palmatífidas e profundamente lobadas. As sépalas castanho-avermelhadas e pétalas amarelo-claras envolvem os estames acastanhados distribuídos em 5 círculos concêntricos. Botões florais podem ocorrer fora da época considerada normal, que vai de maio à julho, época em que a planta perde as folhas. Em agosto, após a floração, inicia-se o desenvolvimento de gemas vegetativas. A frutificação, germinação das sementes, desenvolvimento dos sistemas aéreo e subterrâneo têm lugar na época das chuvas. As sementes reniformes são envoltas por filamentos compridos e lanosos semelhantes ao do algodão. Os frutos formam cápsula ovóide loculicida, com 3-5 valvas, são inicialmente verde-escuros, tornando-se acastanhados quando as valvas se abrem para liberar as sementes.



Figura 1: Fotos de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger cultivada em Araguaína-TO. Detalhe da parte aérea (painel A). Coleta da planta (painel B). Detalhe das raízes da planta (painel C).
Fonte: Banco de dados da Fundação de Medicina Tropical (FMT), Araguaína-TO.

Dentre as substâncias identificadas em *C. regium* estão os óleos essenciais, flavonóides, mucilagem, triterpenóides e taninos. Alguns açúcares como glicose, frutose, rafinose e sacarose, além de ácido arjunólico, derivados da quercetina, apocarotenóides, triacilbenzenos e cetonas voláteis de cadeia longa estão presentes nesta espécie (LIMA *et al.*, 1995).

Entre suas indicações terapêuticas está o tratamento de gastrite, úlcera péptica, infecções ginecológicas, sendo que, grande parte destas ações farmacológicas estão relacionadas ao potencial antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2003).

Silva e colaboradores (1971) realizaram testes para verificar a atividade moluscicida de plantas medicinais do nordeste. Dentre elas, *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, mostrou-se inativa nas condições experimentais realizadas.

Pio Correa (1975), descrevendo *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, citou o emprego popular das raízes como antiinflamatório, “maturativa e dissolvente de abscessos”, além de ter seu uso difundido no tratamento de reumatismo. O autor enfatiza ainda que outras indicações populares referem-se ao tratamento de inflamações intestinais e dores internas.

Rito *et al.*(1994), pesquisaram a atividade antiedematogênica com os extratos líquidos liofilizados das folhas de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, empregando o modelo da indução de edema em aurícula de ratos com óleo de cróton a 5%, onde os resultados obtidos, não foram estatisticamente significativos.

Avaliando a toxicidade do extrato hidroetanólico do algodãozinho, Toledo (1996) chegou a conclusão que este extrato apresentava moderada toxicidade por via intraperitoneal (DL_{50} (i.p) $176,91 \pm 6,64$ mg/kg – camundongos fêmeas) e considerado atóxico pela via oral (v.o) até 2000 mg/kg.

Castro (2000) demonstrou que a administração por via oral (p.o.), intraperitoneal (i.p.) ou intra-cerebroventricular (i.cv.) do 3-0-glicosil-dihidrocanferol (F-52), flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium*, reduziu o número de contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético de maneira dependente da dose. A DL_{50} por via i.p. foi cerca de 3 vezes menor que a DL_{50} por via oral.

Estudos realizados por Castro *et al* (2002) avaliaram as atividades mutagênica e citotóxica, em camundongos, do extrato liofilizado do rizoma desta referida espécie administrado por via intra-peritoneal. A ação citotóxica foi verificada pelo decréscimo da relação de eritrócitos policromáticos/eritrócitos normocromáticos e a ação mutagênica foi observada pelo aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos da medula óssea dos camundongos em relação ao grupo controle.

Dentre as plantas medicinais indicadas como antiinflamatórias por “raizeiros” da região de Goiânia-GO, o algodãozinho obteve o maior número de citações, onde os pesquisadores referiram utilizar o sumo das sementes, folhas, flores após infusão, e ainda a raiz em decocção (SANTOS *et al.*, 2004).

1.3. DOR

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (em inglês, IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial, ou descrita em tais termos de lesão (IASP, 2009), como por exemplo, na cefaléia e na dor pélvica crônica, onde parece ocorrer sem lesão tissular detectável pelos métodos diagnósticos disponíveis na prática clínica atual, favorecendo a hipótese de que pode haver alterações neurofuncionais restritas ao âmbito biomolecular, cuja interação é pouco conhecida entre neuromediadores, neurotransmissores e transdutores de sinais, em uma rede de bilhões de sinapses, dificultando a compreensão da etiologia da dor (ROCHA *et al.*, 2007).

Por outro lado, o trauma e a estimulação do sistema nervoso periférico ou central também podem alterar as respostas imunes. Como consequência, observa-se a ativação de peptídios e receptores, com posterior transdução do sinal para o meio intracelular. Neste contexto, o avanço no conhecimento da neuroanatomia das vias de condução, da neurofarmacologia e da fisiopatologia da dor facilita o desenvolvimento de pesquisas visando novas modalidades de tratamento. Assim, a analgesia efetiva para as síndromes dolorosas ainda é um grande desafio (ROCHA *et al.*, 2007).

Há um sistema específico de dor, o qual transfere informações sobre a lesão tecidual para o local de percepção, o cérebro. A informação nociceptiva é traduzida em sinais eletrofisiológicos que são transmitidos por aparatos perceptivos. Esta transmissão é mediada por diversos mecanismos, incluindo sensibilização periférica/primária e central/secundária. É formada por um conjunto de mediadores químicos que atuam periféricamente e na medula, comparáveis à complexidade dos neurotransmissores no cérebro (FARQUHAR-SMITH, 2007).

O estímulo doloroso é propagado através das fibras aferentes primárias C ou A δ onde se encontram os nociceptores, os quais são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algioênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina (ACh), histamina, bradicinina, leucotrieno (LT), substância P (SP), fator de ativação de plaquetas (PAF), radicais ácidos, íons potássio,

prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX), interleucinas (ILs) e o fator de crescimento do nervo (NGF) (KRAYCHETE *et al.*, 2006).

A bradicinina, assim como o íon potássio, é responsável por provocar intensa dilatação arteriolar e aumentar a permeabilidade capilar, contribuindo para a propagação da reação inflamatória. A bradicinina e a PGE₂ causam alterações nos receptores vanilóides específicos (TRPV1) acoplados aos canais iônicos dependentes de ligantes, via ativação de AMPc e PKs, reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa (ROCHA *et al.*, 2007; STAROWICZ *et al.*, 2007).

A histamina, as PGs e os LTs provocam inflamação e sensibilização das terminações nervosas, surgindo o edema e a dor. Assim, ocorre maior expressão de moléculas de adesão e infiltração de macrófagos e células T no local, causando aumento das citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6 e IL-8) no disco intervertebral (KRAYCHETE *et al.*, 2006).

O NGF aumenta a excitabilidade elétrica dos neurônios aferentes nociceptivos e também promove a formação de contatos sinápticos. Estimula também a produção de PGE₂ nos mastócitos (ROCHA *et al.*, 2007).

A SP age na periferia, promovendo inflamação por seus efeitos sobre os vasos sanguíneos (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular) e células do sistema imune (atração das células do sistema imune para o local da lesão e degranulação de mastócitos com liberação de diversos neuromediadores) (DRESSLER *et al.*, 2005; ROCHA *et al.* 2007). A inibição da transmissão da SP e a emissão periférica podem aumentar o arsenal terapêutico no controle da dor (ONETTA, 2005).

Outro transmissor importante na dor é o glutamato, provável neurotransmissor das fibras do tipo A δ . É um dos transmissores excitatórios mais amplamente utilizados no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, no corno dorsal da medula espinhal, tendo período de ação de apenas alguns milissegundos. Esta neurotransmissão é controlada por interneurônios inibitórios gabaérgicos e glicinérgicos (CAROBREZ, 2003).

As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor.

As fibras A δ são mielinizadas, em função da presença da bainha de mielina e transmitem o estímulo doloroso de forma rápida. As fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades, são responsáveis pela transmissão lenta da dor (LEE *et al.*, 2005). Ambas são classificadas em subtipos A δ 1, A δ 2, C1 e C2 (ROCHA *et al.*, 2007).

A dor pode ser distinguida em três formas:

- Dor nociceptiva, resultante da ativação de neurônios nociceptivos primários, os quais têm função fisiológica importante como a proteção da lesão tecidual;
- Dor de origem inflamatória: originada de todas as formas de inflamação e;
- Dor neuropática: que provém de uma lesão de nervos periféricos e centrais e de neurônios. É acompanhada por dor espontânea intensa e dor provocada por leve estímulo.

A dor inflamatória e a neuropática podem exceder a duração da causa primária da dor. Elas podem se tornar síndromes de dor crônica (ZEILHOFER, 2007). Pode-se inferir, então, que a dor crônica é um estado de constante facilitação da condução nervosa, quando estímulos, que outrora inócuos, podem ser interpretados como dor (alodinia) ou quando a resposta ao estímulo doloroso não é proporcional à intensidade da agressão (hiperalgesia) (KRAYCHETE, 2006).

1.3.1. Testes de atividade antinociceptiva

Os estudos experimentais são na grande maioria realizados em ratos e/ou camundongos, conduzidos de acordo com as normas para experimentação em animais estabelecidas em cada instituição de pesquisa e com os princípios éticos na experimentação animal elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais submetidos a um estímulo nociceptivo são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Por isso, utiliza-se o termo resposta nociceptiva. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente

analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal está experimentando uma resposta álgica (PERAZA, *et al.*, 2007).

A resposta nociceptiva é decorrente da ação de numerosos mediadores químicos que atuam em sítios periféricos, medulares ou centrais e modulam esta resposta (LAPA *et al.*, 2003).

Para avaliação farmacológica, as drogas utilizadas como controles positivos (morfina e/ou analgésicos e/ou antiinflamatórios não-esteroidais - AINES), assim como as doses do extrato de plantas testadas devem ser administradas 1 h ou 30 min antes do estímulo nociceptivo, quando por via oral ou intraperitoneal, respectivamente (PERAZA, *et al.*, 2007).

O teste das contorções abdominais avalia a resposta motora decorrente de um estímulo nociceptivo aplicado por via intraperitoneal. Em camundongos, esta resposta caracteriza-se por contorções do abdômen seguidas de extensão de uma ou ambas as patas. Este modelo geralmente utiliza o ácido acético e é usado para testes de triagem, pois a nocicepção é produzida por um conjunto de eventos, neurotransmissores e neuromoduladores, sendo sensível a analgésicos centrais e/ou periféricos (LAPA *et al.*, 2003).

Outro modelo bastante utilizado é o teste da placa quente. Observa-se o comportamento dos animais de experimentação ao estímulo térmico nociceptivo, caracterizado pela troca rápida do apoio dos pés (“sapateado”), lambar, morder ou levantar uma das patas quando colocados sobre uma superfície aquecida a mais de 50° C. Os resultados são avaliados pela medida da latência ou o tempo decorrido desde o momento em que o animal é colocado sobre a placa até o aparecimento da resposta motora (PERAZA, *et al.*, 2007).

Já o teste do *tail-flick* avalia o tempo de latência que o animal apresenta em retirar a cauda submetida a um estímulo térmico de intensidade superior à 40°C. No caso da placa quente a resposta é de integração central enquanto no modelo do *tail-flick*, o reflexo de retirada da cauda é de integração medular (LAPA *et al.*, 2003).

Também bastante utilizado para avaliar a atividade analgésica de substâncias, o teste da formalina é realizado por meio da injeção intraplantar de formalina na pata traseira de camundongos e ratos (HUNSKAAR & HOLE, 1987). É um modelo bifásico, sendo que

a primeira fase, que se desenvolve até 5 minutos após a injeção da formalina, tem um caráter neurogênico e é sensível a analgésicos opióides. A segunda fase inicia-se 15 a 20 min após a injeção de formalina e atinge valores máximos 30 a 45 min após, é de origem inflamatória e sensível a analgésicos não-esteroidais (TJOLSEN *et al.*, 1992). O índice de nocicepção é avaliado pelo tempo que o animal permanece lambendo, mordendo ou sacudindo a pata injetada.

Com a utilização desses testes não é possível chegar ao mecanismo de ação definitivo do extrato de plantas ou de uma substância testada, porém, a vantagem desses modelos é que representam o início para a caracterização farmacológica de novas drogas capazes de interagir com mediadores da dor e/ou da inflamação, fornecendo assim um ponto de partida para a caracterização das vias de efeito antinociceptivo. O aprofundamento da investigação se dá com a utilização de bloqueadores específicos da resposta analgésica, na tentativa de se identificar as vias responsáveis pelas respostas observadas (PERAZA, *et al.*, 2007).

1.4. INFLAMAÇÃO

A inflamação (do latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significa pegar fogo) representa um processo fisiopatológico fundamental para eliminar estímulos lesivos ao organismo vivo. Trata-se de uma resposta inespecífica, que ocorre de maneira independente da natureza do estímulo causador da lesão (físico, químico ou biológico) e se caracteriza pela presença de rubor (eritema), calor (aumento da temperatura local), tumor (edema) e dor, levando, muitas vezes, à perda da função do órgão ou tecido inflamado (LAPA *et al.*, 2003; BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2007).

Os estudos de atividade inflamatória se iniciaram com Cornelius Celsus no século I d.C., a partir da enumeração dos quatro sinais cardinais da inflamação: rubor, calor, tumor e dor. Posteriormente, um quinto sinal clínico foi acrescentado por Virchow, a perda da função (EDWARDS *et al.*, 1981).

A inflamação é uma resposta complexa do tecido vivo e vascularizado a estímulos irritantes, sendo frequentemente associada a dor e envolvendo eventos como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo

local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido granulomatoso (ANDRADE *et al.*, 2007).

Inflamação fisiológica ou aguda é uma resposta benéfica do organismo de reparo tecidual, no entanto, o caráter duradouro do processo pode estar relacionado com doenças auto-imunes ou neoplasias (BALKWILL, CHARLES & MANTOVANI, 2005).

Os mecanismos fisiopatológicos desencadeados pelo estímulo lesivo representam ações farmacológicas de substâncias endógenas que são liberadas, ou ativadas, no decorrer do processo. Dentre os mediadores do processo inflamatório identificados, encontram-se: aminas vasoativas (histamina, serotonina), eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico como PGs, LTs e PAF), citocinas (ILs), cininas plasmáticas (bradicinina), componentes do sistema complemento (C3a, C5a), radicais livres, entre outros. Um único sinal inflamatório pode ser produzido por um conjunto de mediadores agindo independente e sinergicamente, e um mesmo mediador pode ser ativo em diferentes etapas da resposta inflamatória. O tipo e a quantidade de cada mediador podem variar conforme o desenvolvimento do processo e conforme o tipo de estímulo lesivo. Mediadores de ação rápida (aminas vasoativas, eicosanóides e produtos do sistema cininérgico) modulam a resposta imediata, enquanto que mediadores neo-sintetizados como LTs e ILs controlam o acúmulo e ativação de células no local inflamado (LAPA *et al.*, 2003).

Na reação inflamatória existem eventos vasculares que levam à formação de edema e aqueles que acarretam a migração de leucócitos. Estes eventos são desencadeados por diferentes mediadores que se originam do plasma ou de células locais, podendo ser ampliados ou modificados por mediadores liberados das células inflamatórias que migraram para o local da inflamação (LARSEN & HOLT, 2000).

Os eventos vasculares consistem em dilatação inicial das pequenas arteríolas, resultando no aumento do fluxo sanguíneo, seguido de redução e, a seguir, extase do sangue e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, com exsudação de líquido. A vasodilatação é produzida por diversos mediadores, entre eles, PGE₂, PGI₂ e aminas vasoativas, como a histamina (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

Segundo Sayers (2002) os principais componentes para o desenvolvimento da inflamação são:

- Vasodilatação;
- Aumento da permeabilidade vascular;
- Ativação e adesão celular;
- Coagulação.

Nos eventos celulares, os leucócitos ativados migram para o tecido, onde atuam contra os agentes nocivos. Eles são os protagonistas na defesa do organismo. Essa é uma resposta benéfica que é essencial para a sobrevivência, além de reparar e curar o tecido. A adesão de leucócitos à parede do endotélio dá-se através de moléculas de adesão: selectinas L, P e E, e subsequente migração dos neutrófilos para o interior dos tecidos (SAYERS, 2002). A migração e ativação dos neutrófilos durante a inflamação é o resultado de vários eventos, envolvendo a liberação de diversos mediadores (GOMES *et al.*, 2008).

Entre eles, podem-se citar os mediadores do sistema do complemento, que é constituído por nove componentes principais, C1 a C9 (RAMAGLIA *et al.*, 2008).

A ativação da cascata pode ser desencadeada por três vias:

- Pela clássica, que utiliza uma proteína plasmática C1 para detectar anticorpos;
- Pela via alternativa, que envolve o reconhecimento direto de certas estruturas da superfície microbiana e;
- Pela via da lectina, desencadeada por uma proteína, a lectina de ligação à manose.

A proteína central do complemento, C3, é clivada à C3b, que atua como uma opsonina, ligando-se aos microrganismos, promovendo a fagocitose dos mesmos. Outro fragmento, C3a, estimula a inflamação, agindo como quimioatraente para neutrófilos. Outro peptídeo é o C5a, que estimula a entrada dos neutrófilos no local da infecção, bem como é um componente vascular da inflamação aguda (RAMAGLIA *et al.*, 2008).

Os efetores da resposta inflamatória são citocinas como TNF- α e várias ILs. As citocinas são peptídeos que atuam na própria célula produtora, ou em células próximas ou distantes. São produzidas por uma variedade de células envolvidas na resposta inflamatória, incluindo macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, os quais promovem

diferentes efeitos, tais como expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia e ativação de outras vias inflamatórias (coagulação, complemento, cininas e fibrinólise). Esta resposta local é firmemente controlada pela produção de interleucinas antiinflamatórias, como IL-10 e antagonista do receptor de IL-1 (SAYERS, 2002). O TNF- α , por sua vez, tem sido chamado de “citocina sentinela”, já que inicia a defesa no local da lesão, ativando outras citocinas e fatores tróficos. Ele pode ser liberado por diversas células, inclusive as de Schwann, e exercer seus efeitos através da interação com o receptor do TNF- α tipo I (sTNRF1), que tem sua expressão aumentada após a lesão neuronal (KRAYCHETE *et al.*, 2006).

Diversas estratégias terapêuticas capazes de inibir a produção de TNF- α foram, com sucesso, usadas no tratamento clínico para o gerenciamento de doenças inflamatórias crônicas, particularmente artrite reumatóide (TRACEY *et al.*, 2008).

Também participam do processo inflamatório as aminas vasoativas serotonina (5-HT) e histamina (PASSOS *et al.*, 2007).

A 5-HT é sintetizada a partir do triptofano numa reação mediada pela triptofano sintetase. Cerca de 90% desta amina são produzidos nas células enterocromafins intestinais. É encontrada também em plaquetas humanas, mastócitos de ratos, mas não de humanos, e no sistema nervoso central. A 5-HT possui multiplicidade de ações biológicas em função da variedade de receptores farmacológicos existentes. Suas ações são traduzidas pela larga família de receptores serotoninérgicos divididos em sete classes, de 5-HT₁ a 5-HT₇ (WOUTERS *et al.*, 2007).

A 5-HT tem sido reconhecida como um mediador endógeno da resposta inflamatória nos tecidos periféricos. O edema induzido por formalina é aumentado com a co-administração de 5-HT (DOAK & SAWYNOK, 1997). A indução de hiperalgesia por carragenina sugere que os subtipos de receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} tenham efeito facilitador no mecanismo nociceptivo na espinha dorsal de ratos (ZHANG *et al.*, 2001). Estes dados reforçam o aumento da participação de 5-HT_{1A} na resposta nociceptiva (PARADA *et al.*, 2001).

A histamina foi o primeiro mediador com função biológica identificado no início do século XX, e seus receptores têm sido alvos de drogas por mais de sessenta anos. É um mediador armazenado em mastócitos e basófilos juntamente com a 5-HT. A histamina é uma amina formada a partir da histidina por ação da histidina descarboxilase e

encontrada em vários tecidos, destacando-se os pulmões, pele e trato gastrointestinal. Suas ações fisiológicas resultam de ação em quatro receptores farmacológicos denominados H₁, H₂, H₃ e H₄ (RABER, 2007).

Os efeitos da histamina nos processos fisiológicos e patológicos, bem como novas funções ainda estão sendo elucidados. Suas ações estão bem caracterizadas nos processos inflamatórios, secreção gástrica e como neurotransmissor. Durante a inflamação, a histamina é liberada pelos mastócitos e basófilos. Exerce ação sobre células musculares lisas e células endoteliais, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Na pele, a histamina acarreta uma resposta tripla: vermelhidão local pela vasodilatação, edema devido ao aumento da permeabilidade vascular e dilatação, associada à vasodilatação indireta via estimulação por reflexos axonais (THURMOND *et al.*, 2008). No sistema gastrointestinal a histamina é essencial para a secreção ácida (TAHIRO *et al.*, 2001).

Existem quatro classes de antagonistas da histamina: os antagonistas dos receptores H₁, H₂, H₃ e H₄. Os receptores H₁ são expressos por múltiplos tipos de células, incluindo células endoteliais e do músculo liso, provocando vasodilatação e broncoconstrição. Os antagonistas dos receptores H₁, como a difenidramina (1^a geração) e loratadina (2^a geração) têm sido usados por muitos anos para o tratamento da resposta alérgica inflamatória. Além disso, os receptores H₁ medeiam diversos efeitos da histamina no sistema nervoso central, como o ciclo sono-vigília. Por esta razão, a primeira geração de antagonistas de receptores H₁ promovem efeito sedativo devido à passagem pela barreira hematoencefálica e bloqueio de receptores centrais. A redução da atividade locomotora, funções cognitivas e sensação de dor são observadas em camundongos deficientes de receptores H₁ (INOUE *et al.*, 1996).

A histamina é também encontrada nas células parietais da mucosa gástrica, atuando sobre receptores H₂. Assim, os antagonistas dos receptores H₂ (anti-ulcerosos) inibem as ações estimulatórias da histamina sobre a secreção ácida gástrica. Os principais fármacos desse grupo são representados por cimetidina e ranitidina, nizatidina e famotidina (RABER, 2007).

A histamina é encontrada no cérebro em menor proporção do que em outros tecidos, como a pele e os pulmões. Sua liberação endógena no SNC é regulada pelos receptores H₃, os quais são frequentemente expressos como autoreceptores pré-sinápticos

(RABER, 2007). São encontrados primeiramente no sistema nervoso, atuando na neurotransmissão central e periférica. Apesar dos agonistas de receptores H_3 , como a tioperamida não serem utilizados na clínica, eles são utilizados em pesquisas científicas (THURMOND *et al.*, 2008).

Os receptores H_4 não são frequentemente expressos como os outros receptores histaminérgicos. Eles são encontrados nas células hematopoiéticas periféricas como eosinófilos, neutrófilos e células T $CD4^+$, sugerindo uma importante função no sistema imune (RABER, 2007).

A bradicinina, outro mediador do processo inflamatório, é um peptídeo vasoativo que provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, resultando sua ação vasodilatadora, em parte, pela produção de PGI_2 e pela liberação de óxido nítrico (NO). Trata-se de um potente produtor de dor, ação que é potencializada pelas PGs (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005).

As PGs são produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico. Este é um ácido graxo poliinsaturado, contendo 20 átomos de carbono (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), derivado da dieta ou da conversão do ácido graxo essencial (ácido linoléico). O ácido araquidônico não é encontrado livre nas células, mas sim na forma esterificada nos fosfolípidios da membrana, sendo liberado destes pela ação de fosfolipases celulares, por exemplo, a fosfolipase A_2 , que é liberada por estímulos mecânicos, físicos e químicos, ou por outros mediadores. Os metabólitos do ácido araquidônico, também chamados de eicosanóides, são sintetizados por duas classes principais de enzimas, as ciclooxigenases (COX), dando origem às PGs e TX e as lipoxigenases (LOX), formando os LTs e as lipoxinas. Esses metabólitos estão envolvidos em numerosas patologias, particularmente nas doenças inflamatórias, sendo alvos importantes para a descoberta de drogas antiinflamatórias (YEDGAR *et al.*, 2007).

Atualmente, são conhecidas três isoformas de COXs: COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 é constitutivamente expressa, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins, sendo a principal responsável por manter as condições hemostáticas no organismo. A COX-2, por outro lado, é geralmente ausente na maioria dos tecidos normais, mas pode ser induzida por inúmeros estímulos, como IL-1, TNF- α e demais mediadores inflamatórios. É responsável pela produção de concentrações elevadas de prostanóides durante a

inflamação. A COX-3 encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao paracetamol do que a COX-1 e COX-2. Postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual as drogas analgésicas e antipiréticas como os AINES desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre (HIKIJ I *et al.*, 2008).

Apesar dos AINES serem frequentemente prescritos, eles podem causar efeitos adversos resultantes da inibição da atividade das COXs, incluindo perfuração e hemorragia do trato gastrointestinal. Tais ações, que parecem ser decorrentes da inibição da COX-1, levaram à busca de inibidores mais seletivos, o que resultou no surgimento de drogas mais específicas para COX-2 (SCHOLICH & GEISLINGER, 2006), como, por exemplo, rofecoxibe e celecoxibe, que foram os primeiros inibidores específicos para a COX-2 aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de artrite reumatóide, osteoartrite e alívio da dor aguda (CAPONE *et al.*, 2003).

Contudo, estes inibidores seletivos de COX-2 inibem a síntese de PGI₂ que possui efeitos protetores sobre o sistema vascular, o que pode explicar a maior incidência de ataques cardíacos e acidente vascular cerebral entre aqueles que utilizam estes fármacos (SCHOLICH; GEISLINGER, 2006). Além disso, estudos clínicos têm sugerido que esses inibidores poderiam causar outros efeitos indesejáveis, tais como lesões gastrintestinais e hipersensibilidade (ARAICO *et al.*, 2007).

O TXA₂ é um potente agente de agregação plaquetária e vasoconstritor. É altamente instável, rapidamente é convertido à sua forma mais estável, TXB₂ (HIKIJ I *et al.*, 2008).

Os LT, por sua vez, constituem uma família de substâncias farmacologicamente ativas e potentes produzidas a partir do ácido araquidônico por ação da 5-LOX. São enzimas citosólicas solúveis, encontradas preferencialmente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSCHI *et al.*, 2007).

Entre os LT, pode-se citar o LTB₄, um potente agente quimiotático para leucócitos polimorfonucleares, eosinófilos e monócitos. Em concentrações elevadas, estimula a agregação de leucócitos polimorfonucleares e promove a degranulação e a geração de superóxido. Promove a adesão de neutrófilos às células endoteliais,

estimulando também, a síntese de citocinas pró-inflamatórias em monócitos e linfócitos (GOMES *et al.*, 2008).

As lipoxinas, que foram recentemente adicionadas à família dos produtos bioativos gerados a partir do ácido araquidônico, contrastam com a maioria dos outros mediadores lipídicos, que são essencialmente pró-inflamatórios tais como LT, PAF e prostanóides. Estão envolvidas na inibição do recrutamento leucocitário e dos componentes celulares da inflamação. Elas inibem a quimiotaxia dos neutrófilos e sua adesão ao endotélio (FIERRO & SERHAN, 2001).

O óxido nítrico, outro mediador do processo inflamatório, é sintetizado a partir da L-arginina e do oxigênio molecular pela enzima NOS. É um potente vasodilatador, devido sua ação no músculo liso vascular, inibe a adesão dos monócitos na superfície da célula endotelial e a agregação plaquetária e controla a proliferação das células musculares lisas (ZOCCALI, 2007).

O PAF é um lipídio biologicamente ativo, que pode produzir efeitos em concentrações extremamente baixas (inferiores a 10^{-10} mol/L). Foi descrito como o primeiro elemento capaz de ativar e agregar as plaquetas. Tem a capacidade de produzir muitos dos fenômenos da inflamação. Possui potentes efeitos biológicos, como constrição das vias respiratórias, hipotensão, e aumento da permeabilidade vascular. Quando aplicado localmente, produz vasodilatação, eritema, aumento da permeabilidade vascular e formação de pápulas. A administração em doses mais altas provoca hiperalgesia. É quimioatraente para neutrófilos e monócitos e capaz de ativar a fosfolipase A₂, com produção de eicosanóides. (HIKIJ *et al.*, 2008).

Antiinflamatórios são fármacos que podem agir em vários passos do processo fisiopatológico, podendo inibir a biossíntese de mediadores pela interação direta com enzimas-chaves (como inibidores da COX), ou reduzindo as concentrações de substratos (redução da liberação de ácido araquidônico). Adicionalmente podem agir inibindo a liberação de mediadores pré-formados (por ex. histamina) ou por meio da imunoestimulação (por ex.: maturação de células mielóides ou estimulação de fagocitose), removendo a substância irritante e diminuindo a agressão tecidual (SAFAIHY & SAILER, 1997).

Atualmente existem vários produtos, naturais e sintéticos, que são utilizados para o tratamento dos mais diversos processos inflamatórios. Entretanto, até o momento,

não foi identificado o antiinflamatório ideal, quer seja pela limitação de sua eficácia, quer seja pela amplitude dos seus efeitos adversos. Neste aspecto, é importante salientar que, muitos dos antiinflamatórios disponíveis atualmente são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de PGs, o que representa uma importante limitação ao uso do produto. Assim, a procura por substâncias que apresentem potente atividade antiinflamatória e efeitos adversos limitados continua sendo bastante estimulada na comunidade científica. Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade antiinflamatória/antinociceptiva (VERGNOLLE, 2008).

1.4.1. Testes de atividade antiinflamatória

Existem atualmente vários modelos experimentais usados para testar a atividade antiinflamatória de uma substância, como por exemplo:

- Modelo de edema de pata induzido no animal por um agente flogístico (carragenina, dextrana, histamina, serotonina);
- Granuloma induzido por pelota de algodão;
- Aumento de permeabilidade capilar induzido por agentes inflamatórios;
- Pleurisia induzida por carragenina, entre outros.

O modelo do edema de pata avalia o aumento do volume da pata do animal após a injeção subplantar do agente flogístico. Este edema é agudo e progressivo, proporcional à intensidade da resposta inflamatória e seu desenvolvimento depende do agente flogístico utilizado. O edema produzido pela carragenina é bifásico, nos primeiros 60 a 90 min relacionado à liberação de mediadores da inflamação como histamina e 5-HT e, posteriormente, após as 3 horas, mantido principalmente por ação de PGE₂ (VINEGAR, TRUAX & SELPH, 1989; DI ROSA, GIROUD & WILLOUGHBY, 1971). Já o edema induzido por dextrana (polímero formado por resíduos de alfa-D-glicopiranosil) é decorrente da liberação de histamina e 5-HT pelos mastócitos. O edema também pode ser induzido pela injeção de um mediador inflamatório o que permite avaliar mais diretamente o efeito da droga (DI ROSA, GIROUD & WILLOUGHBY, 1971).

O modelo de permeabilidade capilar avalia a quantidade de proteína extravasada por entre as células endoteliais que se retraem em decorrência da ação dos mediadores da inflamação e o modelo de pleurisia mede o número de leucócitos no exsudato pleural. O modelo do granuloma é usado para avaliar o processo de inflamação subcrônica e mede a formação do tecido granulomatoso no decorrer de cerca de 7 dias (LAPA *et al.*, 2003).

1.5. FEBRE

A febre pode ser definida como uma elevação controlada da temperatura corporal acima do nível normal, resultante da alteração do termostato hipotalâmico. Trata-se de um processo distinto de hipertermia. Durante a hipertermia, o ponto de regulação hipotalâmico não é alterado e o aumento de temperatura observado é decorrente do comprometimento dos mecanismos de dissipação de calor ou de situações em que essa dissipação não é suficiente para a manutenção da temperatura em níveis normais devido à produção excessiva de calor ou a temperaturas externas elevadas (KLUGER, 1991).

A regulação da temperatura corporal no SNC é exercida por diferentes estruturas e conexões presentes a partir do hipotálamo e sistema límbico, passando pelo tronco cerebral até a medula espinhal e gânglios simpáticos (MACKOWIAK & BOULANT, 1996). Entretanto, é a área pré-óptica do hipotálamo anterior (APOHA) a principal responsável pela termorregulação (BOULANT, 2000).

Existem pelo menos duas vias termosensíveis ascendentes oriundas dos neurônios termocéptivos e dos neurônios de segunda ordem (presentes no corno dorsal): a via espinotalamocortical, que transmite informações de percepção e discriminação da sensação termal cutânea ao cortex somatosensorial; e a via espinoparabraquiopréptica, que transmite informações sobre a temperatura cutânea para a APOHA, ativando respostas termorregulatórias quando preciso. Dessa forma, a via espinoparabraquiopréptica é a responsável pelas respostas termorregulatórias autonômicas, tais como vasodilatação/vasoconstrição da pele, sudorese, ativação do tecido adiposo marrom ou tremores da musculatura esquelética e a via espinotalamocortical pelas respostas termorregulatórias comportamentais, tais como a locomoção para ambientes termicamente favoráveis (MORRISON, 2008).

Quando o organismo se encontra em temperatura acima dos níveis normais ocorre aumento da migração e motilidade de neutrófilos e monócitos, da fagocitose e pinocitose, proliferação e potencialização das ações das células T helper, maior liberação e potenciação das ações do interferon, aumento da produção de anticorpos, aumento de efeitos bactericida de antimicrobianos e, ainda, cria um ambiente térmico desfavorável para o crescimento e sobrevivência de microrganismos. Entretanto, o aumento da temperatura também provoca sensações de mal-estar e desconforto, podendo ainda ser potencialmente perigoso em situações de desidratação, caquexia, lesões cerebrais e/ou hepáticas, doenças cardiorespiratórias, gravidez e, nos aumentos acima dos níveis tolerados, pode ser incompatível com a manutenção da vida (KLUGER, 1991).

As substâncias que induzem febre são designadas de pirogênicos e podem ser divididos em exógenos e endógenos. Em geral, a maioria dos pirogênicos exógenos é oriunda de produtos gerados por microrganismos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (ZEISBERGER, 1999) ou por toxinas de veneno de animais peçonhentos, tais como o veneno da cobra indiana - *Naja naja* (GURIN *et al.*, 1985) ou do veneno de escorpiões, como por ex., da espécie *Tityus serrulatus* (PESSINI, *et al.*, 2006). Os pirogênicos endógenos compreendem as proteínas termosensíveis e os mediadores lipídicos. Sua produção é geralmente estimulada pelos pirogênicos exógenos, mas também por lesões, traumas e estresse.

Em 1948, Beeson apresentou a primeira evidência de que os pirogênicos exógenos atuam por meio da produção e/ou liberação de pirogênicos endógenos pelas células do hospedeiro. Estes, por sua vez, seriam os responsáveis pela ativação dos centros cerebrais, os quais controlam a temperatura, promovendo elevação da temperatura corporal (ATKINS, 1960). Atualmente, entretanto, a ação direta de pirogênicos exógenos não pode ser descartada, pois existem receptores específicos para componentes da parede celular (DINARELLO, 2004).

Entre os pirogênicos exógenos mais estudados podemos citar o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram negativas e o muramil-dipeptídeo (MDP), componente da parede celular de bactérias Gram positivas. Entre os principais pirogênicos endógenos estão as citocinas, quimiocinas, PGs, fator liberador de corticotropina (CRF) e endotelina (ET) (FABRÍCIO *et al.*, 2005).

As citocinas podem ser definidas como “proteínas regulatórias” secretadas pelas células brancas do sangue e por uma variedade de outras células no corpo. As ações pleiotrópicas das citocinas incluem numerosos efeitos nas células do sistema imune e modulação de respostas inflamatórias” (TURNBULL & RIVIER, 1999; DANTZER & KELLEY, 2007).

É bem demonstrado que vários tipos celulares incluindo macrófagos, células endoteliais e linfócitos produzem citocinas com atividade pirogênica. Dentre elas, IL-1 β , IL-6 e TNF- α são consideradas as principais citocinas envolvidas na resposta febril (ROTH *et al.*, 2002).

Outra citocina também classificada como pirogênio endógeno e liberada por macrófagos em resposta ao LPS, é o TNF- α . Este mediador, quando administrado por via periférica ou central, induz resposta febril em coelhos (DINARELLO *et al.*, 1986), ratos (KETTELHUT & GOLDBERG, 1988; ZAMPRONIO *et al.*, 2000) e humanos (MICHIE *et al.*, 1988). Contudo, Klir e colaboradores (1995) demonstraram que o tratamento de ratos com uma dose não pirogênica de TNF promove redução da resposta febril em resposta ao LPS, enquanto que o tratamento com receptor solúvel de TNF exacerba a febre induzida pelo LPS, evidenciando, desta forma, uma ação antipirética do TNF em determinadas condições experimentais (CONTI *et al.*, 2004).

Apesar das citocinas serem importantes mediadores da resposta febril, vários estudos demonstram que elas não são os mediadores finais da febre. Há evidências de que as citocinas promovam febre por meio da estimulação da síntese de PGE₂ e CRF (DAVIDSON *et al.*, 2001; ENGBLOM *et al.*, 2002; ROTHWELL, 1989; 1990a).

O CRF é um peptídeo composto de 41 aminoácidos, sintetizado nas células parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV). O CRF está envolvido na mediação da resposta febril e exerce seus efeitos por meio da ativação de dois subtipos de receptores, CRF₁ e CRF₂. A administração i.c.v. de CRF em ratos aumenta a atividade simpática (BROWN *et al.*, 1982), estimula a atividade termogênica do tecido adiposo marrom (LEFEUVRE *et al.*, 1987) e eleva a temperatura corporal (DIAMANT & DE WIED, 1991), sugerindo a participação deste fator na indução da termogênese nesta espécie.

A ET-1 é um potente peptídeo vasoconstritor secretado por células endoteliais. A família das ETs é composta por peptídios relacionados compreendendo a ET-1, a ET-2, e a ET-3 (INOUE et al., 1989) e o contrator intestinal vasoativo (VIC), equivalente à ET-2 de rato e presente em camundongos (BLOCH *et al.*, 1991).

Koshi e colaboradores (1992) foram os pioneiros em investigar a influência das ETs sobre a temperatura corporal e demonstraram que a injeção i.v. de ET-1 ou 4-Ala-ET-1 (agonista seletivo do receptor ET_B) causa aumento significativo da temperatura de coelhos acordados.

Em 1998, Fabrício e colaboradores demonstraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de ET-1 em ratos induziu aumento significativo da temperatura retal. Efeito este totalmente prevenido pelo bloqueio seletivo de receptores ET_B com BQ-788, porém não alterado pelo BQ-123, um antagonista seletivo de receptores ET_A. Demonstraram também que a resposta febril induzida pela administração intravenosa de LPS em ratos foi substancialmente reduzida pela injeção i.c.v. de BQ-788 e pela injeção intravenosa de bosentan, um antagonista não seletivo de receptores ET_A e ET_B. No entanto, não foi alterada pela injeção i.c.v. de BQ-123. A partir desses dados os autores sugeriram que as ETs participam, via ativação central de receptores ET_B, e juntamente com outros mediadores, da resposta febril induzida pelo LPS. Corroborando esses dados, estes mesmos autores demonstraram que a injeção i.v. de LPS, em dose que causa febre de longa duração, promove aumento na produção de ET-1 e seu precursor imediato, a big-endotelina no fluido cérebro-espinhal (CSF) de ratos.

Vários estudos apontam as PGs como os prováveis mediadores responsáveis pela ativação dos neurônios termosensíveis da APOHA, uma vez que foi observada rápida elevação da concentração de PGE₂ no CSF do terceiro ventrículo de animais experimentais após administração sistêmica de LPS (MILTON, 1989). Além disso, a microinjeção de inibidores de COX na APOHA reduziu a febre induzida por LPS (SCAMMELL *et al.*, 1998). Stitt (1973) mostrou que PGE₂ injetada i.c.v. induz febre em ratos e coelhos. A PGE₂ ainda é considerado o principal eicosanóide envolvido na resposta febril (FELEDER *et al.*, 2004), embora outros derivados do ácido araquidônico, particularmente a PGF_{2α}, também possam induzir febre em animais experimentais (SOUZA *et al.*, 2002).

1.5.1. Testes de atividade antipirética

A liberação endógena de citocinas e a consequente produção de PGE₂ ocorrem devido ao estímulo pirogênico e levam a um reajuste do centro termoregulatório e instalação da febre. Diversas substâncias exógenas, como os polissacarídeos presentes em fungos e bactérias, são utilizados na tentativa de mimetizar infecções em estudos de febre. Estas substâncias são obtidas principalmente a partir do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e das espécies bacterianas *E. coli* e *S. aureus* (FABRÍCIO *et al.*, 2005).

Devido ao grande interesse clínico nas respostas fisiopatológicas envolvidas na sepse causada por bactérias Gram-negativas, esta classe de bactérias é a mais estudada. Na composição da parede celular das bactérias Gram-negativas existe uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente: lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo. O LPS consiste no lipídio A (endotoxina), ao qual estão ligadas duas regiões de natureza polissacarídica, respectivamente, o *core* e as cadeias laterais. O lipídeo A é um glicofosfolípídeo cujo papel biológico consiste na participação nos mecanismos de patogenicidade da célula bacteriana (TRENT, 2004).

A administração periférica de LPS induz uma variedade de eventos mediados pelo SNC que em conjunto são considerados resposta inflamatória aguda. Evidências indicam que esta toxina estimula a produção de mediadores que são formados em cascata e, dessa forma, considera-se que a resposta febril induzida pelo LPS seja um processo multimediado, dependente da síntese de vários outros fatores chamados pirogênios endógenos (SCHOTANUS *et al.*, 1993).

Apesar de existir grande número de estudos baseados nestas toxinas, alguns autores têm questionado determinados aspectos deste modelo. Um dos pontos discutidos é que estas toxinas são injetadas em grande quantidade e de uma só vez sendo, portanto, de pouca relevância fisiológica, já que durante uma infecção além de existir um foco inflamatório, as bactérias liberam aos poucos estas toxinas e em quantidades maiores do que aquelas utilizadas nos estudos de resposta febril. Além disso, o LPS injetado é usualmente removido da circulação 1 h após a injeção intravenosa e induz uma febre com duração de 6 a 8 h, diferindo das febres naturais que duram desde horas e até mesmo semanas. Podem, ainda, ocorrer tanto elevações de temperatura mantidas por longos períodos quanto pode ocorrer picos de elevação (MPHAHLELE *et al.*, 2004).

Na maioria dos casos de sepse a febre é induzida e mantida por um longo período em razão da estimulação pirogênica contínua (GOURINE *et al.*, 1998).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética da planta *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, conhecida vulgarmente como Algodãozinho-do-campo, em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade antinociceptiva de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) no modelo da formalina;
- Investigar o efeito antiinflamatório de diferentes doses do EHA por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina;
- Investigar a atividade antipirética de diferentes doses de EHA no modelo de febre induzida por lipopolissacarídeo (LPS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. LOCAIS DE TRABALHO

A coleta da planta e o preparo do extrato hidroalcoólico foram realizados pela Fundação de Medicina Tropical (FMT) que disponibilizou ainda informações sobre o estudo etnofarmacológico, além do extrato bruto seco da raiz (10 g) para os ensaios farmacológicos. Os ensaios para verificação das atividades biológicas foram realizados no Laboratório de Farmacologia da FCFRP/USP.

3.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta da planta foi realizada em Araguaína-TO (Localização geográfica: LAT.(S): 07° 16' 12.5"; LONG.(W): 048° 15' 42.4"), pelos profissionais da Fundação de Medicina Tropical do Tocantins no mês de maio de 2008. A planta foi identificada e catalogada pelo Herbário da Universidade Estadual de Goiás (UEG), sob responsabilidade da Dra. Mirley Luciene dos Santos, com registro nº 5.902, nome científico *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger.

3.3. PREPARO DA PLANTA PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO

As raízes foram submetidas à lavagem para retirar a sujeira e fragmentadas, sendo posteriormente submetidas à secagem em estufa (Hydrosan, modelo HY-4 BOSDA), a 40°C por 72 horas. Em seguida as raízes foram trituradas em moinho de malha 0,5 cm (Tecnal modelo Tipo Willye TE – 650). O material obtido foi acondicionado em caixas de papelão e armazenado ao abrigo da luz em ambiente seco, com temperatura controlada a 24°C.

3.4. PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O material vegetal triturado (200 g) foi submetido à extração por maceração utilizando álcool etílico à 70% como solvente, acondicionado em erlenmeyer (3 L) à temperatura ambiente e homogeneizado duas vezes ao dia durante dez dias. Após este período, o macerado foi filtrado. Em seguida, o solvente foi removido sob pressão reduzida (110 bar) a uma temperatura de 40°C com auxílio do rota evaporador (Ika, RV-06).

Posteriormente, o extrato foi colocado no liofilizador para a retirada da água residual. Obteve-se, portanto, 22,8 g de extrato seco com rendimento de 11,4%.

3.5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, pesando entre 180 e 200 g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP.

Os animais foram mantidos à temperatura média de $24^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, em ciclos de claro/escuro de 12 h, com livre acesso a ração e água. Os animais estiveram em jejum de sólidos 12 h antes da realização dos experimentos e foram habituados, no laboratório, para os testes horas antes da experimentação.

Os protocolos foram conduzidos de acordo com as normas para experimentação em animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP.

3.6. TRATAMENTOS

Os animais receberam por via oral o EHA dissolvido em solução 0,5% de etanol. Animais controle foram tratados por via oral (v.o.) com veículo (controle negativo) ou indometacina 8 mg/kg, diluída em tris[hidroximetil] aminometano HCl, pH 8,2 (controle positivo). Os tratamentos foram efetuados em volume de 0,5 ou 1,0 mL, por animal, dependendo da concentração do extrato administrada.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EHA

3.7.1. Teste da formalina

Para verificação do efeito antinociceptivo do EHA foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.

Os animais receberam 50 μ L de formalina a 1% (correspondente a 0,37% de uma solução de formaldeído) na superfície dorsal da pata posterior direita. Os tratamentos foram administrados aos animais 60 min antes da injeção do estímulo doloroso. Os animais foram tratados com 0,5 mL por v.o com EHA nas doses de 80, 160, 320, 640 mg/kg, indometacina 8 mg/kg e veículo (solução de etanol a 0,5%). Para dose de 1280 mg/kg foi necessário dobrar o volume administrado por v.o para 1,0 mL da concentração de 640 mg/kg por questões de solubilidade do extrato no veículo utilizado.

Logo após a injeção os animais foram colocados individualmente numa superfície plana e sobre eles um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação.

Como indicativo de dor foi considerado o número de vezes que os animais sacudiam a pata (número de *flinches*) que recebeu o estímulo (TJOLSEN et al, 1992). Os *flinches* foram contados e agrupados em períodos de 5 min, desde a injeção da formalina (tempo zero) até 60 min.

3.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EHA

3.8.1. Teste do edema induzido por carragenina

Seis grupos experimentais (n=5 ratos/grupo) foram tratados por v.o. com EHA nas doses de 160, 320, 640 e 1280 mg/kg, indometacina 8 mg/kg e veículo (solução de etanol a 0,5%).

Antes de qualquer tratamento, os animais foram submetidos a uma medida do volume de suas patas (direita e esquerda).

Uma hora após os tratamentos foi administrado por via subplantar (s.pl.), na pata esquerda traseira de cada animal 0,1 mL de uma solução de carragenina 1%. A pata contralateral (controle) recebeu o mesmo volume de solução salina 0,9% (WINTER, RISLEY e NUSS, 1962). Após a injeção, o volume das patas foi medido utilizando-se um

pletismômetro (Ugo Basile 7140) em intervalos regulares de 60 min até a sexta hora. Os resultados foram expressos como a variação do volume entre as patas esquerdas e direitas.

3.9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPIRÉTICA DO EHA

3.9.1. Ensaio de febre induzida por LPS em ratos

A resposta febril foi avaliada de acordo com o método descrito por Coelho *et al.* (1992). Esta avaliação foi realizada por meio da indução da febre em ratos por estímulo pirogênico utilizando LPS *E. coli*.

Os experimentos foram realizados no período entre 8:00 e 17:00 horas com a temperatura da sala mantida em 28 ± 1 °C. Os animais foram colocados em caixas de polipropileno (20x17x12cm) no dia anterior ao experimento, em grupos de dois, para ambientação. No dia do experimento, a temperatura basal de cada animal foi determinada 3 vezes em intervalos de 30 min antes do início do experimento por inserção de uma sonda (n° 402, Yellow Springs Instruments Co. Inc., Ohio, USA), lubrificada com vaselina, de 4 cm dentro do reto dos ratos acoplada ao teletermômetro (modelo 46 TUC, YSI, EUA), por cerca de 30 seg. Durante cada medida da temperatura o animal foi manipulado cuidadosamente e sem ser removido da caixa. Este procedimento foi realizado para minimizar o surgimento de variações da temperatura induzidas por estresse decorrente do manuseio. Somente animais com temperatura basal entre 36,8 e 37,4 °C foram selecionados para o ensaio.

O estímulo pirogênico foi administrado 60 min após o tratamento dos animais com o EHA nas doses de 160, 320, 640 e 1280mg/kg e indometacina 8 mg/kg. O LPS foi diluído em salina estéril e injetado por via intravenosa (i.v.) na veia caudal dos animais na concentração de 5 µg/kg (0,2 mL por animal). Animais controles receberam o mesmo volume de salina injetado por via i.v. Os estímulos foram injetados entre 10:00 e 11:00 horas para evitar variações na resposta febril decorrentes do ciclo circadiano.

Após a injeção dos estímulos, a temperatura foi medida em intervalos de 30 min durante 6 horas. Os resultados foram expressos como a variação da temperatura (ΔT) ao longo do tempo.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (erro padrão da média). As comparações estatísticas foram efetuadas por análise de variância a um fator (ANOVA one-way) seguida por teste de Bonferroni com a utilização do programa estatístico Prism. O nível de significância considerado foi de 5% ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DE EHA SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA, EM RATOS

A injeção de formalina em animais controle induziu uma resposta bifásica, caracterizada pela ocorrência de sacudidas da pata injetada, sendo que a primeira fase da resposta ocorreu de 0 a 14 min e a segunda de 15 a 60 min após a administração de formalina (Figuras 2 e 3).

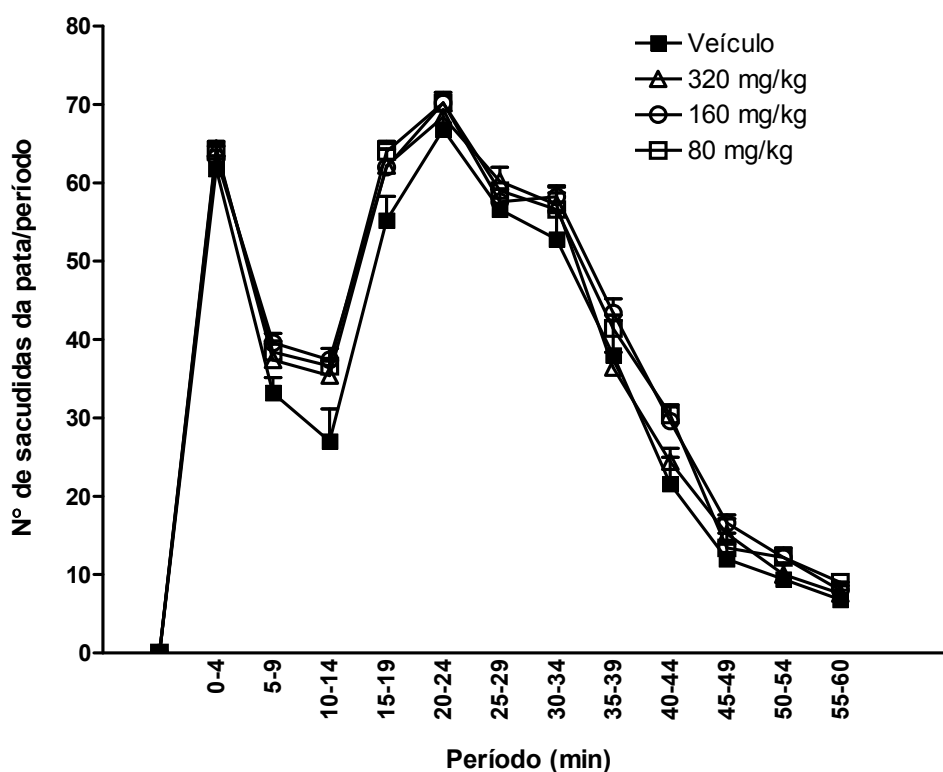


Figura 2: Efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina. O EHA nas doses indicadas ou o seu veículo (etanol a 0,5%) foram administrados por via oral 1 h antes da injeção intraplantar de formalina (1%). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de sacudidas da pata/período de tempo. N=5 para cada grupo.

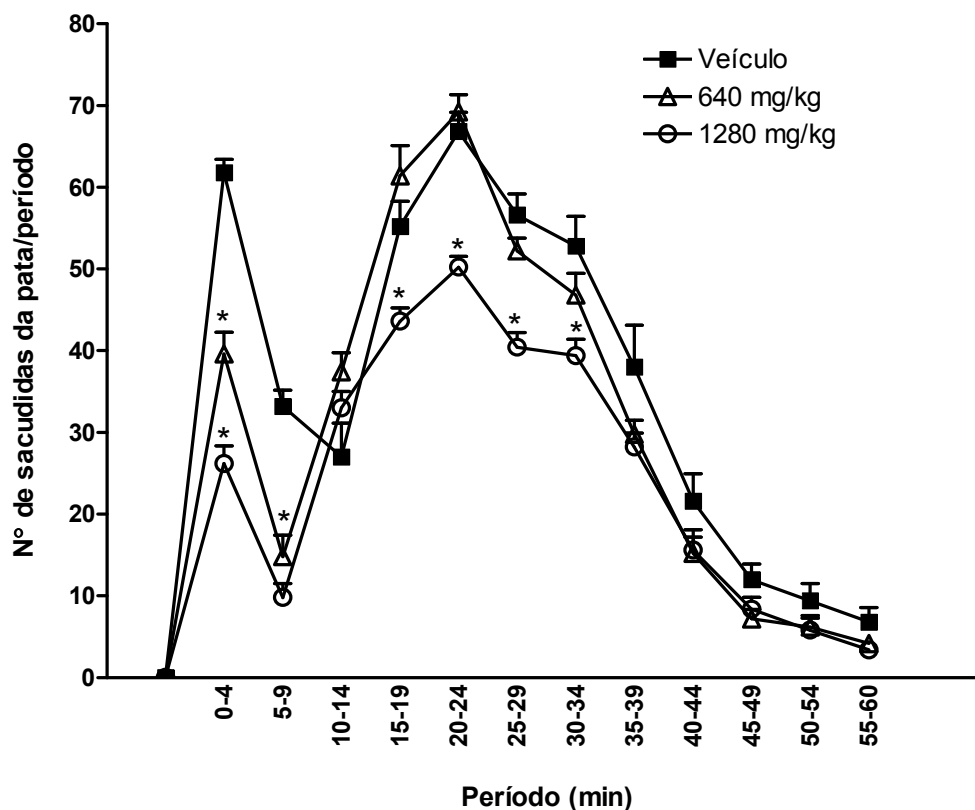


Figura 3: Efeitos de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina. O EHA nas doses indicadas ou o seu veículo (etanol a 0,5%) foram administrados por via oral 1 h antes da injeção intraplantar de formalina (1%). Os resultados estão expressos como média \pm EPM do número de sacudidas da pata/periódico de tempo. N=5 para cada grupo. * $p < 0.05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo.

O EHA foi administrado nas doses de 80, 160, 320, 640 e 1280 mg/kg por via oral 1h antes da injeção de formalina (1%). Não se verificou efeito inibitório do EHA nas doses de 80, 160 e 320 mg/kg (Figura 2), porém os grupos tratados com as doses de 640 e 1280 mg/kg (Figura 3) apresentaram redução no número de sacudidas da pata.

Na primeira fase do teste da formalina, o número de sacudidas da pata do grupo controle, no tempo 0 a 4 min, foi $61 \pm 1,6$, sendo reduzido para $39,6 \pm 2,6$ e $26,2 \pm 2,1$ com o tratamento nas doses de 640 e 1280 mg/kg de EHA, inibindo 36% e 57%, respectivamente.

Na segunda fase do teste apenas a dose de 1280 mg/kg de EHA apresentou efeito inibitório. Houve redução no número de sacudidas da pata no período de 15 a 34 min, sendo a inibição de 21%, 25%, 28% e 26% para os intervalos de 15 - 19, 20 - 24, 25 - 29 e 30 - 34 min, respectivamente.

4.2. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DE EHA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA, EM RATOS

O EHA foi administrado por via oral nas doses de 160, 320, 640 e 1280 mg/kg 1h antes da injeção de carragenina (100 µg/pata). Verificou-se que o pré-tratamento dos animais com EHA nas doses de 160 e 320 mg/kg não alterou o edema de pata induzido por carragenina durante todo o período observado (Figura 4). Por outro lado, o EHA, quando administrado nas doses de 640 e 1280 mg/kg foi capaz de inibir o edema de pata, sendo que na dose de 640 mg/kg verificou-se que a inibição foi significativa estatisticamente a partir da terceira hora após a administração de carragenina e, para a dose de 1280 mg/kg a inibição foi observada a partir da segunda hora após a injeção do estímulo (Figura 5).

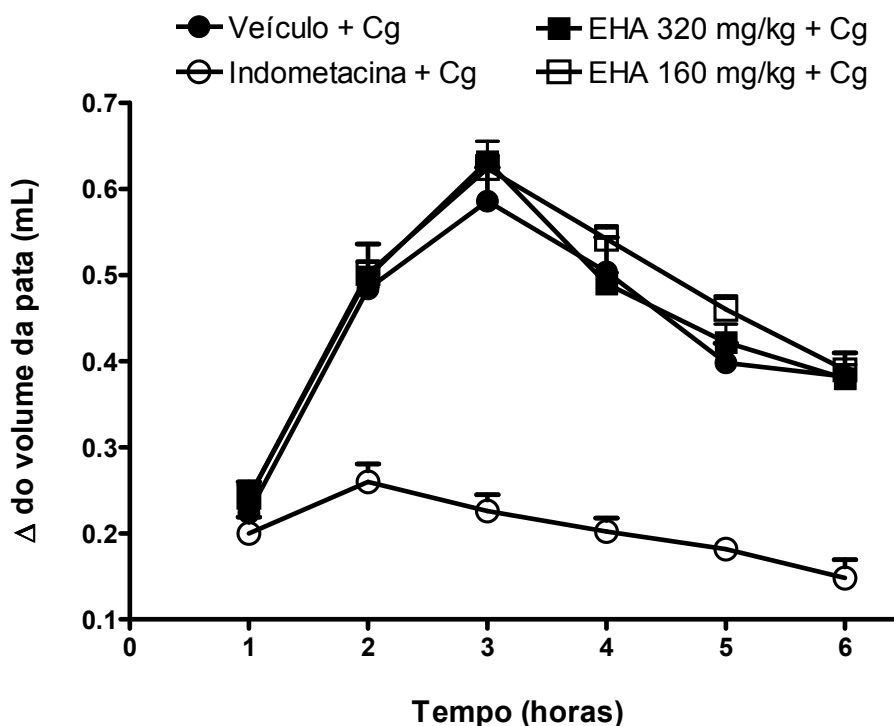


Figura 4: Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) nas doses de 160 e 320 mg/kg sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (Cg). O EHA nas doses indicadas ou o seu veículo (etanol a 0,5%) foram administrados por via oral 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata). Animais controle foram tratados com indometacina (8 mg/kg, v.o). Os valores representam a média \pm EPM da variação no volume da pata de 5 animais para cada grupo.

O pico de ação edematogênica da carragenina foi verificado na terceira hora após sua administração intraplantar. Nesse tempo, o EHA nas doses de 640 e 1280 mg/kg, inibiu o edema de pata em 22,5 % e 36,2 %, respectivamente (Figura 5).

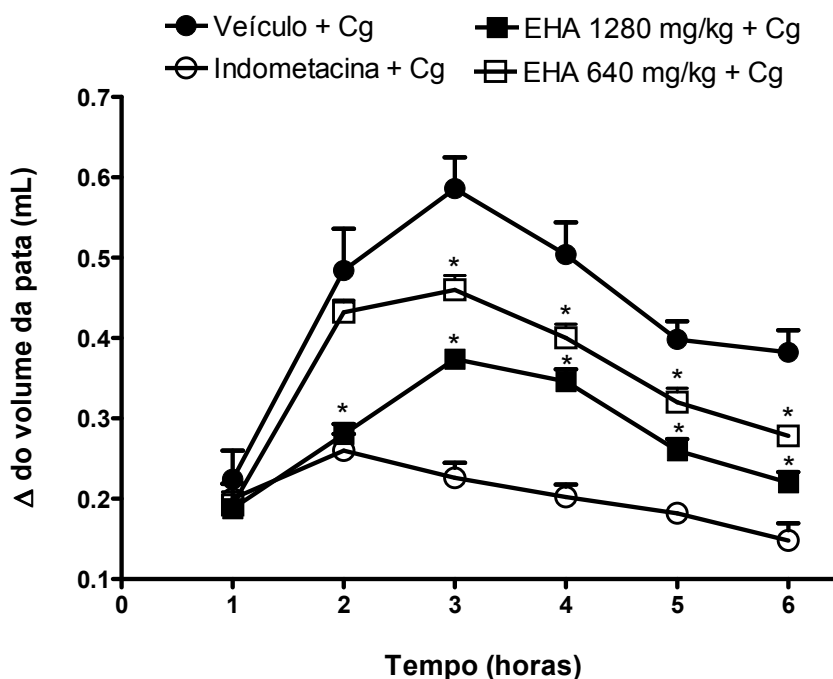


Figura 5: Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) nas doses de 640 e 1280 mg/kg sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina (Cg). O EHA nas doses indicadas ou o seu veículo (etanol a 0,5%) foram administrados por via oral 1 h antes da injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata). Animais controle foram tratados com indometacina (8 mg/kg, v.o). Os valores representam a média ± EPM da variação no volume da pata de 5 animais para cada grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo + Cg.

Como controle positivo foi utilizada a indometacina (8 mg/kg, v.o.). Verificou-se que este antiinflamatório não esteroideal preveniu o aparecimento do edema de pata induzido por carragenina durante todo o período observado (Figuras 4 e 5).

4.3. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE DIFERENTES DOSES DO EHA SOBRE A FEBRE INDUZIDA POR LPS, EM RATOS

Foi avaliado o efeito do EHA sobre uma resposta inflamatória sistêmica. Para isso foi utilizado o modelo da resposta febril induzida pelo LPS. As doses do EHA testadas (160, 320, 640 e 1280 mg/kg) e os controles (salina e indometacina) foram administradas v.o 1 h antes da injeção i.v. de LPS.

O aumento de temperatura induzido pela administração i.v de LPS iniciou-se a partir de 1,5 h, atingiu um pico cerca de 2,5 h e durou até 6 h após a injeção de LPS. Animais que receberam somente a injeção dos veículos (etanol a 0,5%, v.o. e solução salina estéril, i.v.) não apresentaram alteração significativa de temperatura durante todo o período observado. O pré-tratamento realizado com indometacina (8 mg/kg, v.o) mostrou efeito antipirético de cerca de 1°C, verificado a partir de 1,5 h após a injeção do estímulo, mantendo-se durante todo o período de observação (Figura 6).

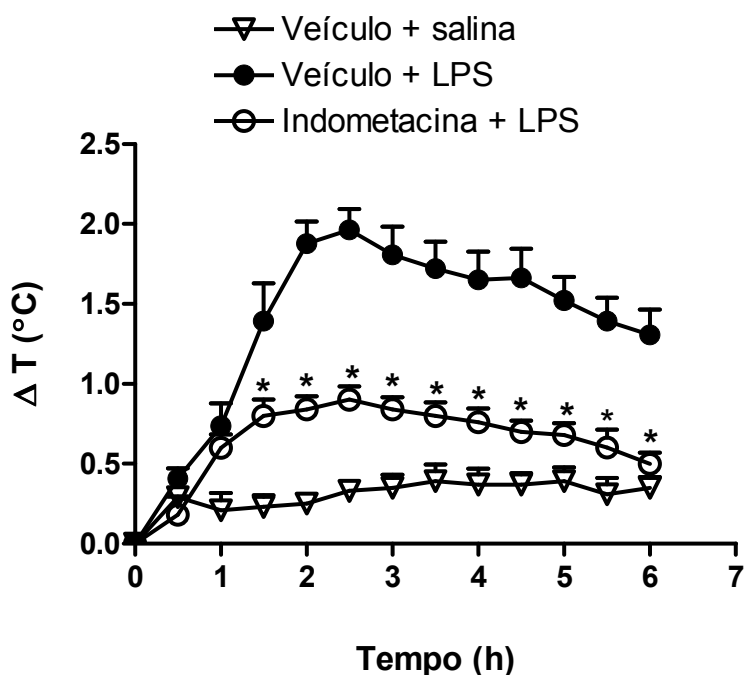


Figura 6: Efeito antipirético da indometacina sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) em ratos. A indometacina (8 mg/kg) diluída em Tris-HCl (Tris, pH 8,2) foi administrada por via oral 1 h antes da administração de LPS (5 µg/kg, i.v). Animais controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril por via i.v.. Os pontos representam a média ± EPM da variação da temperatura retal (ΔT, em °C) de 5 animais para cada grupo, medida por telemetria. * p<0.05 quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo + LPS.

As doses de 160, 320 e 640 mg/kg não alteraram a febre induzida por LPS em nenhum dos tempos avaliados (Figuras 7 e 8).

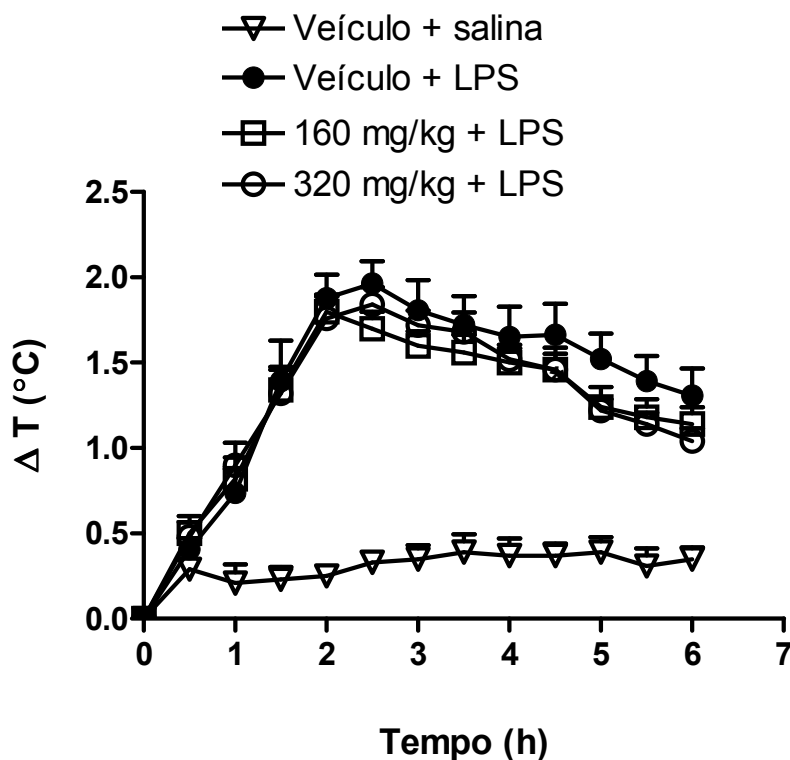


Figura 7: Efeito de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) em ratos. O EHA foi administrado nas doses de 160 e 320 mg/kg, por via oral 1h antes da injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.). Animais controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril por via i.v. Os pontos representam a média ± EPM da variação da temperatura retal (ΔT, em °C) de 5 animais para cada grupo, medida por telemetria.

O efeito antipirético do EHA foi observado quando utilizada a dose de 1280 mg/kg. A inibição ocorreu a partir da 2ª hora após a administração de LPS e perdurou durante todo o período de observação, com pico máximo de inibição de 0,7°C entre a 2 h e 3 h (Figura 8).

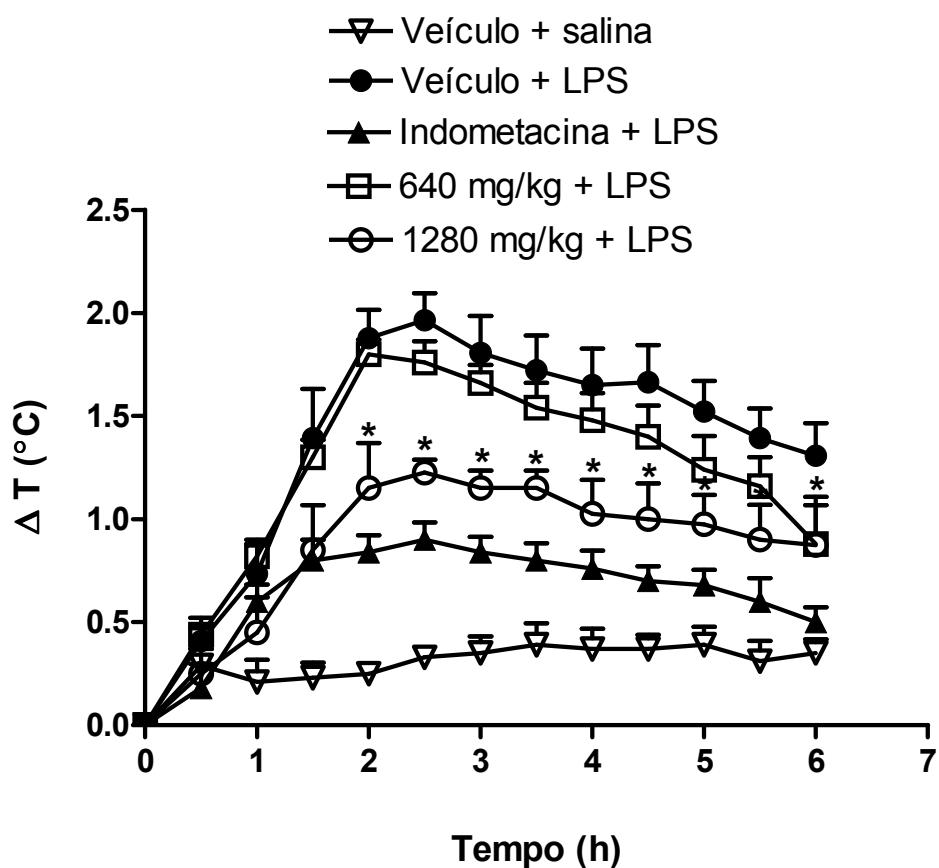


Figura 8: Efeito de diferentes doses do extrato hidroalcoólico de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (EHA) sobre a febre induzida pelo lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) em ratos. O EHA nas doses de 640 e 1280 mg/kg e a indometacina (8 mg/kg) diluída em Tris-HCl (Tris, pH 8,2) foram administradas, por via oral 1h antes da injeção de LPS (5 µg/kg, i.v.). Animais controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril por via i.v. Os pontos representam a média ± EPM da variação da temperatura retal (ΔT , em °C) de 5 animais para cada grupo, medida por telemetria. * $p < 0.05$ quando comparado ao valor correspondente do grupo veículo + LPS.

5. DISCUSSÃO

O uso terapêutico de novas substâncias com atividade analgésica para o tratamento de vários tipos de dor, tanto de origem neurogênica quanto inflamatória, vem aumentando significativamente. O emprego de tais substâncias só é possível e autorizado pelas agências reguladoras após a investigação de suas ações terapêuticas e toxicológicas em estudos pré-clínicos e clínicos.

Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório podem ser utilizados para verificar atividade antinociceptiva de extratos e compostos. Cada modelo possui características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (PIETROVSKI, 2004).

A investigação da atividade antinociceptiva do EHA foi realizada empregando o teste da formalina, que é muito utilizado para o estudo de nocicepção. Este teste representa um modelo de estudo de dor moderada e tônica (HUNSKAAR *et al.*, 1985).

A injeção subplantar de formalina na pata traseira de roedores induz uma resposta comportamental bifásica. Permite, portanto, evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa, a primeira fase que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção da formalina (nocicepção de origem neurogênica) e resulta de estímulo químico direto de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, principalmente as fibras do tipo A δ e C. Esta fase pode ser inibida por drogas analgésicas opióides como a morfina (GONÇALVES *et al.* 2008). Resultados experimentais demonstram que a SP e a bradicinina participam da primeira fase (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

A segunda fase ocorre entre 20 a 30 min após a injeção da formalina. Mediadores inflamatórios formados nos tecidos periféricos, como as PGs, 5-HT, histamina, SP e bradicinina, induzem mudanças funcionais nos neurônios do corno dorsal que, ao longo do tempo, promovem a facilitação da transmissão em nível espinhal. Esta evidência sugere que o processo de inflamação periférica está envolvido na segunda fase (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Fármacos antiinflamatórios, esteroidais e não-esteroidais, reduzem a resposta dos animais apenas na segunda fase do teste da formalina, exceto o ácido acetilsalicílico e o paracetamol, os quais são eficazes em ambas as fases (HUNSKAAR & HOLE, 1987).

Neste estudo, o EHA foi capaz de reduzir a dor durante as duas fases do processo álgico. Na primeira fase, o EHA inibiu em 36% e 57% utilizando respectivamente as doses de 640 e 1280 mg/kg e na segunda fase ocorreu uma inibição de 28% com a dose de 1280 mg/kg. A ação do EHA durante o desenvolvimento da dor neurogênica sugere uma ação direta sobre as fibras aferentes nociceptivas, que pode reduzir o limiar de estimulação dos neurônios do corno dorsal. Esta redução poderia ser decorrente do antagonismo exercido em receptores vanilóides e/ou de glutamato localizados nas fibras aferentes (SMIDERLE *et al.*, 2008).

A inibição do processo álgico durante a fase inflamatória sugere a existência de substâncias no extrato que possam atuar sobre as terminações nervosas periféricas, por meio da inibição de COX ou antagonista de serotonina (ASONGALEM *et al.*, 2004).

O EHA produziu efeito antinociceptivo significativo de forma dose dependente em ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, sendo, contudo mais efetivo na primeira fase desse modelo, o que sugere uma ação semelhante aos fármacos opióides. Desta forma, os resultados no teste da formalina reforçam a hipótese que esta planta é dotada de importante atividade antinociceptiva, confirmando sua utilização popular.

A atividade antiinflamatória do EHA foi confirmada no modelo de edema de pata induzido por carragenina através da redução do volume de líquido deslocado.

A carragenina é um colóide obtido por extração em fase aquosa de variedades naturais de algas das famílias *Gigartinales*, *Solieriales*, *Hypneaales* e *Furcellariales* da classe Rhodophyceae (algas vermelhas). Sua administração na pata promove intensa vasodilatação e extravasamento plasmático pela liberação de mediadores que contribuem também à intensa migração celular para o sítio inflamatório (CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; HENRIQUES *et al.*, 1987).

Enquanto agente flogístico, a carragenina induz a formação de exsudato rico em proteínas que contém grande número de neutrófilos e metabólitos do ácido araquidônico pelas vias da COX e LOX (ZHANG *et al.*, 2001). O pico máximo do edema ocorre na terceira hora após a injeção de carragenina, que é caracterizado pela ação de PGE₂ sobre a permeabilidade vascular (DI ROSA, 1971). Apresenta três fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira fase (0-90 min) relaciona-se à liberação de histamina e 5-HT, a segunda fase (90-150 min) envolve a liberação de cininas,

enquanto as PGs estão envolvidas na terceira fase (150-360 min) (DI ROSA *et al.*, 1971; GARCIA *et al.*, 2004).

Nossos resultados demonstraram que o EHA reduziu de maneira dose-dependente o edema de pata induzido pela administração intraplantar de carragenina em ratos. As doses de 640 e 1280 mg/kg do extrato inibiram 22,5 % e 36,2 %, respectivamente, a formação do edema três horas após a injeção do estímulo inflamatório.

Conforme verificado em nosso estudo, a indometacina, considerada um inibidor da COX, é capaz de impedir esse processo inflamatório. Este dado está de acordo com o descrito na literatura que demonstra que tanto a indometacina, quanto a dexametasona (um antiinflamatório esteroideal), são drogas antiinflamatórias com importante efeito antiedematogênico no modelo do edema de pata induzido pela carragenina (HENRIQUES *et al.*, 1987). Portanto, sugere-se que o mecanismo de ação antiinflamatória do extrato esteja relacionado à inibição de síntese de PGs, como ocorre com a indometacina, no processo inflamatório induzido por carragenina (DI ROSA, 1971). Uma possibilidade é que o extrato testado possua mecanismo de ação semelhante ao deste antiinflamatório, porém mais testes são necessários para comprovar esta afirmação.

O bloqueio da COX inibe a síntese de PGs e TXs. Essas substâncias têm participação nos fenômenos eritematosos, na dor e na febre que acompanham o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (ARAICO *et al.*, 2007).

A atividade antiinflamatória de muitas plantas foi atribuída aos seus constituintes flavonóides (PARMAR & GOSH, 1978) e triterpenos (AHMAD *et al.*, 1983), estando ambos presentes na composição de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, conforme citado por Lima *et al.* (1995).

Flavonóides são compostos fenólicos antioxidantes de vasta distribuição entre as plantas que têm demonstrado importantes atividades antiinflamatórias tanto *in vitro* como *in vivo* (CALIXTO *et al.*, 2004). São conhecidos por exercerem um potente efeito inibitório sobre inúmeras enzimas relacionadas à ativação celular e à produção de mediadores inflamatórios (BRITO *et al.*, 2007).

Os taninos, como visto anteriormente, também presentes na composição química do Algodãozinho, são polifenóis amplamente distribuídos nas plantas. Os efeitos biológicos dos taninos incluem atividades antioxidantes (HAGERMAN *et al.*, 1999) e a

inibição de mediadores e enzimas envolvidas no processo inflamatório, tais como as citocinas (FELDMAN *et al.*, 2001), NO e COX-2 (LEE, LEE & MAR, 2003).

A febre é uma resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro em contato com pirógenos exógenos, como os polissacarídeos presentes em fungos e bactérias, o que resulta em aumento temporário da temperatura corporal basal. A liberação endógena de citocinas (IL-1 β e IL-6, TNF- α) a partir de macrófagos e leucócitos e a conseqüente biossíntese hipotalâmica de PGE₂ (provável mediador final da febre) ocorre em resposta ao estímulo pirogênico e leva a um reajuste do centro termoregulatório e a instalação da febre.

A atividade antipirética do EHA foi investigada nas doses de 160, 320, 640 e 1280 mg/kg, utilizando como estímulo febril o LPS. Os resultados demonstraram que o EHA, na dose de 1280 mg/kg, inibiu a resposta febril induzida pelo LPS em 0,7°C. Pelo fato das PGs serem os principais mediadores envolvidos no modelo utilizado, o efeito antipirético do EHA sugere uma possível inibição da síntese desses mediadores por componentes presentes no extrato. Assim, evidencia-se a necessidade de estudos posteriores para confirmar essa hipótese, além de estudos sobre o(s) componente(s) químico(s) presente(s) no extrato e responsável(is) por tal inibição.

A realização de estudos biomonitorados dos compostos serão necessários, objetivando elucidar os mecanismos pelos quais as substâncias presentes no EHA promovem os efeitos terapêuticos investigados e relatados neste estudo.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos neste estudo, o extrato hidroalcoólico das raízes de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger, conhecida vulgarmente como Algodãozinho-do-campo, quando administrado por via oral, possui propriedades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética. Essas atividades podem ser decorrentes do efeito de componentes presentes no extrato em inibir a síntese de mediadores inflamatórios, tais como prostaglandinas e citocinas.

Tais resultados confirmam a hipótese levantada pelo estudo etnofarmacológico realizado em Araguaína-TO, colaborando para a validação científica de seu uso popular, e indicam possibilidades reais para esta planta como fonte de princípio(s) ativo(s), cuja pesquisa aprofundada pode levar à descoberta de uma nova e melhor alternativa terapêutica aos estados patológicos de inflamação, dor e febre. Para tanto, devem ser realizados experimentos adicionais para isolamento e caracterização dos constituintes químicos e, sobretudo, para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antipirética, bem como estudos de toxicidade e segurança.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Carraluma tuberculata* alcoholic extract. **Fitoterapia** 46, 357-360, 1983.
- ALICE, C. B. *et al.* **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacológico**. Canoas: ULBRA, p. 205, 1995.
- ANDRADE, A. *et al.* **Levantamento das plantas de uso medicinal mais usadas no Tocantins para o tratamento de doenças tropicais**. Anais do Congresso Saúde Pública Araguaína- Tocantins, 2003.
- ANDRADE, *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology** 109, p. 464-471, 2007.
- ARAICO, A. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. **Life Sciences**, v. 80, p. 2108-2117, 2007.
- ASONGALEM, E. A. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activities of *Erigeron floribundus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 301-308, 2004.
- ATKINS, E. Pathogenesis of fever. **Physiological**, v. 40, p. 580-546, 1960.
- BALKWILL, F.; CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**, p. 211-217, 2005.
- BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.**, v. 16, n. 1, p.109-139, 2006.
- BERWICK, A. **A aromaterapia holística**. Rio de Janeiro: Record, p. 270, 1996.
- BLOCH, K.D. *et al.* cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin-2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin-2. **Genomics**, v.10, p.236-242, 1991.
- BOLDI, A. M. Libraries from natural product-like scaffolds. **Chemical Biology**, v. 8, p. 281-286, 2004.
- BOULANT, J. A. Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. **Clinical Infections Diseases**. v. 31, p. 157-161, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 17, de 24 de fevereiro de 2000. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.
- BRITO, F. A. *et al.* Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 105 – 115,

2007.

BROWN, M.R. *et al.* Corticotropin-releasing factor: effects on the sympathetic nervous system and oxygen consumption. **Life Sciences.**, v.30, p.207-210, 1982.

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

CALIXTO, J. B. *et al.* Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131 –134, 2005.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. **In: Plantas medicinais sob a ótica da química moderna.** Chapecó. Editora Argos. p. 297-315, 2001.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Parte I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93 – 103, 2004.

CAPONE, M.L. *et al.* Clinical pharmacology of selective COX-2 inhibitors. **International Journal of Immunophatology & Pharmacology**, 16 (2), p. 49-58, 2003.

CAROBREZ, A. P. . A transmissão glutamatérgica como alvo molecular de drogas para o tratamento dos transtornos de ansiedade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, v. 25, n. Supp 2, p. 52, 2003.

CASTRO, M. S. A. **Mecanismos envolvidos no efeito antinocepcivo do 3-O-glicosildihidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* ("algodãozinho")** [Tese de Doutorado]. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina, 2000.

CASTRO, D. B. *et al.* Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2002.

COELHO, M. M.. Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. **Journal Physiological.**, v.263, p.R423-R427, 1992.

CONTI, B. *et al.* Cytokines and fever. **Bioscience.** v. 9, p. 1433-1449, 2004.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica.** 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 392 –402, 1971.

DANTZER R.; KELLEY, K. W. Twenty years of research on cytokine-induced sickness

behavior. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, p. 735-741, 2007.

DAVIDSON, J. *et al.* Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. **Pflugers**, v. 442, n. 4, p. 526-33, 2001.

DI ROSA *et al.* Screens of anti-inflammatory drugs. **Journal Pharmaceutical Pharmacology**. 23, p. 297-298, 1971.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, England, v. 104, p. 15-28, 1971.

DI STASI, L. C. *et al.* **Plantas medicinais: arte e ciências. Um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: Ed. da UNESP, 230p, 1996.

DIAMANT, M.; De WIED, D. Autonomic and behavioral effects of centrally administered corticotropin-releasing factor in rats. **Endocrinology**, v.129, n.1, p.466-454, 1991.

DINARELLO, C. A. *et al.* Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **Journal Medical**. v. 63, p. 1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A. Infection, fever, and exogenous and endogenous pyrogens: some concepts have changed. **Journal Endotoxin Research**, v. 10, p. 201-22, 2004.

DOAK, G. J.; SAWYNOK J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience**, v. 80, p. 939-949, 1997.

DRESSLER, D.; SABERI, F. A.; BARBOSA, E. R. Botulinum toxin: mechanisms of action. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 180-185, 2005.

EDWARDS, J. W. C. *et al.* The formation of a structure with features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an *in vivo* tissue cultures system. **Journal of pathology**, v.134, n.2, p. 147-153, 1981.

ELIZABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de novas substâncias ativas**. Florianópolis: Ed.da UFSC, 1ª Ed., 1999.

ENGBLOM, D. *et al.* Prostaglandins as inflammatory messenger across the blood-brain barrier, **Journal Molecular Medical**. v. 80, p. 5-15, 2002.

FABRICIO, A. S. *et al.* The effects of selective and nonselective cyclooxygenase inhibitors on endothelin-1-induced fever in rats. **Journal Physiological** . v. 288, n. 3, p. 671-7, 2005.

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

FARNSWORTH, N. R., BINGEL, A. S. New natural products and plant drugs with

pharmacological, biological or therapeutical activity. **Springer**, New York, p.61-73, 1997.

FELDMAN, K. S. *et al.* In vitro and In vivo inhibition of LPS-stimulated tumor necrosis factor-alpha secretion by the gallotannin beta-D-pentagalloylglucose. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 11, p. 1813-1815, 2001.

FELEDER, C. *et al.* Preoptic α_1 - and α_2 -noradrenergic agonists, induce, respectively, PGE₂-independent and PGE₂-dependent hyperthermic responses in guinea pigs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 286, p. 1156-1166, 2004.

FIERRO, I. M.; SERHAN, C. N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Review**, v. 34, n. 5, p. 555-566, 2001.

GARCIA, M.A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extracts from leaves of *Pimenta racemosa varozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69-73, 2004.

GOMES, A. C. *et al.* MTA-induced neutrophil recruitment: a mechanism dependent on IL-1 β , MIP-2, and LTB₄. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics**, v. 106, n. 3, p. 450-456, 2008.

GONÇALVES, J. C. R. *et al.* Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological Pharmacy Bull.** 31 (5), p. 1017–1020, 2008.

GOURINE, A. V.; RUDOLPH. K.; TESFAIGZI, J.; KLUGER, M. J. Role of hypothalamic interleukin-1b in fever induced by cecal ligation and puncture in rats. **Am. J. Physiology**, v.275, p.754-761, 1998.

GURIB-FAKIM, A. . Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, 27, 1-93, 2006.

GURIN, V. N. *et al.* Central action of snake venoms on body temperature in rats. **Farmakol Toksikol.** v. 48, n. 6, p. 99-101, 1985.

HAGERMAN, A. E. *et al.* Tannins as biological antioxidants. **Basic. Life Sci.** v. 66, p. 495-505, 1999.

HENRIQUES, M. G. M. O. *et al.* Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 243 – 249, 1987.

HIKIJ, H. *et al.* The roles of prostanoids, eukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 107–126, 2008.

HUSNKAAR, S. *et al.* Formalin test in mice, auseful technique for evaluating mild analgesia. **Journal Neurosciences V.** 14, p. 69-76, 1985.

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

IASP (International Association for the Study of Pain). *IASP Pain Terminology*. 2^a ed. Seattle, 1994. Disponível em: <[http:// www.iasp-pain.org/terms-p.html](http://www.iasp-pain.org/terms-p.html) >. Acesso em maio 2009.

INOUE, I. *et al.* Analysis of histamine H₁ receptor deficient mice: role in locomotor activity and anaphylaxis. **Taniguchi Symposium on Brain Science**, v. 19, p. 139–149, 1996.

KETTELHUT, I. C.; GOLDBERG, A. L. Tumor necrosis factor can induce fever in rats without activating protein breakdown in muscle or lipolysis in adipose tissue. **Journal Clinical Investigation**, v. 81, n. 5, p. 1384-1389, 1988.

KIRIZAWA, M. **Contribuição ao conhecimento morfo-ecológico e do desenvolvimento anatômico dos órgãos vegetativos e de reprodução de *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger – Cochlospermaceae**. [Tese de Doutorado]. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1981.

KLIR, J.J. *et al.* Systemic but not central administration of tumor necrosis factor α attenuates LPS-induced fever in rats. **Am. Journal Physiology**, v. 268, p. R480-R486, 1995.

KLUGER, M.J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Review**, v.71, p.93-127, 1991.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. p. 4-5, 1988.

KOSHI, T. *et al* Pyrogenic action of endothelin in conscious rabbit. **Biochemical Biopharmacy Research Commun.**, v.186, n.3, p.1322-1326, 1992.

KRAYCHETE, D. C. *et al.* Citocinas Próinflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n. 3, p. 199-206, 2006.

LAPA, A. J. *et al.* **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Gráfica Metrópole. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 119 p, 2003.

LARSEN, G. L.; HOLT, P. G.. The concept of airway inflammation. **American Journal Respiratory and Critical Care Medicine**, v.162, p. S2-S6, 2000.

LEE, S.J.; LEE, I.S.; MAR, W. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucose in murine macrophage cells. **Arch. Pharmacological Research**, v. 26, p. 832-839, 2003.

LEEB-LUNDBERG, L. M.*et al.* Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. International union of pharmacology. **XLV Pharmacological reviews**, v. 57, p. 27-77, 2005.

LEFEUVRE, R.A. *et al.* Activation of brown fat thermogenesis in response to central injection of corticotropin releasing hormone in the rat. **Neuropharmacology**, v.26, n.8,

p.1217-21, 1987.

LIMA *et al.* Metabólitos secundários de *Cochlospermum regium*. **Fitoterapia**. 66, p.545-546, 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, p. 13-14, 2002.

MACIEL, R. L. **Caracterização química e avaliação da qualidade e da estabilidade de produtos fitoterápicos e homeopáticos preparados com *Lychnophora pinaster* Mart. e *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão Filho em comparação com *Arnica montana* L.** [Dissertação de Mestrado]. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

MACKOWIAK, P.A.; BOULANT, J.A. Fever's glass ceiling. **Clinical Infection Diseases**., v. 22, p. 525-536, 1996.

MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products natureceuticals . **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MICHIE, H.R. *et al.* Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**, v. 104, n. 2, p. 280-286, 1988.

MILLER, L. G. Herbal Medicinals: Selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. **Archives of Internal Medicine**, v. 158, p. 2200-11, 1998.

MILTON, A.S. Thermoregulatory actions of eicosanoids in the central nervous system with particular regard to the pathogenesis of fever. **N.Y. Academic Sciences**., v. 559, p. 392-410, 1989.

MONTUSHI, P. *et al.* Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug discover today**, p. 404-412, 2007.

MORRISON, S.F. *et al.* Central control of thermogenesis in mammals. **Physiology**. v. 93, n. 7, p. 773-797, 2008.

MOTA, D. K. A. S. *et al.* Plantas medicinais indicadas antiinflamatórias por “raizeiros” da região de Goiás. **Infarma**. V. 16, nº 1-2, 2004.

MPHAHLELE, N.R.; FULLER, A.; ROTH, J.; KAMERMAN, P. R. Body temperature, behavior, and plasma cortisol changes induced by chronic infusion of *Staphylococcus aureus* in goats. **Am Journal Regul Integr Comp Physiology**. 287(4), R863-9, 2004.

NETO, A. G. **Obtenção e screening contra dor, inflamação, doença de chagas e Leishmaniose do extrato hidroalcoólico bruto das raízes de *Pfaffia glomerata***. Franca: UNIFRAN, 2003.

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

OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M. **Atividade antibacteriana do extrato**

hidroalcoólico e frações dos rizomas de *Cochlospermum regium*. Resumos do XIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil. Res. 008, 1994.

OLIVEIRA, F. S., SOUSA, D.P., ALMEIDA, R.N. Antinociceptive. Effect of Hydroxydihydrocarvone. **Biol. Pharm. Bull.**, 31 (4), p. 588—591, 2008.

ONETTA, R. C. **Bases neurofisiológicas da acupuntura no tratamento da dor.** Monografia do Curso de Fisioterapia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, p. 63, 2005.

PARADA, C.A. *et al.*. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formaline-induced nociception. **Neuroscience**, 102(4), p.937-944, 2001.

PARMAR, N.S.; GHOSH. M. N. N. Current trends in flavonoid research. **Indian Journal of Pharmacy**, 12, p. 213-228, 1978.

PASSOS G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 330- 332, 2007.

PERAZA, G. G. *et al.* O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo de produtos de origem natural. **Vitalle**, v. 19(1), p. 35-44, 2007.

PESSINI, A.C.; SANTOS, D.R.; ARANTES, E.C.; SOUZA, G.E. Mediators involved in the febrile response induced by *Tityus serrulatus* venom in rats. **Toxicon**, v. 48, p. 556-566, 2006.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart.** Curitiba. [Dissertação Mestrado] - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Imprensa Nacional (Ministério da Agricultura, Ind. e Comércio). Rio de Janeiro, v. 1, 747 p., 1975.

RABER, J.; Histamine receptor-mediated signaling during development and brain function in adulthood. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 64, p. 735-741, 2007.

RAMAGLIA, V. *et al.* The complement system in the peripheral nerve: Friend or foe? **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3865–3877, 2008.

RITTO, J. L. A. *et al.* Estudo farmacognóstico dos extratos do algodãozinho-do-campo. **In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 15. Livro de resumo nº 73. Caxambu, 1994.

ROCHA, A. P. C. *et al.* Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 57: 1: 94-105, 2007.

RODRIGUES, V. E.; CARVALHO, D. A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados.**

Lavras: UFLA, 2001.

ROTH, J. *et al.* Influence of systemic treatment with cyclooxygenase inhibitors on lipopolysaccharide-induced fever and circulating levels of cytokines and cortisol in guinea-pigs. **Pflugers**, v. 443, p. 411-417, 2002.

ROTHWELL, N.J. CRF is involved in the pyrogenic and thermogenic effects of interleukin 1 α in the rat. **Journal Physiology**, v.256, p.E111-E115, 1989.

ROTHWELL, N.J.; HARDWICK, A.J.; LINDLEY, I. Central actions of interleukin-8 in the rat are independent on prostaglandins. **Hormon Metabolism Research.**, v.22, p.595-596, 1990a.

SAFAIHY, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Medica**, v. 63, p. 487-493, 1997.

SANTOS, P. A. *et al.* Triterpenoids and flavonoids from *Lychnophoriopsis candelabrum* – Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 509-512, 2004.

SAYERS, R. D., Aortic aneurysm, inflammatory pathway and nitric. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, 84, p. 239-246, 2002.

SCAMMELL, T. E. *et al.* Microinjection of a cyclooxygenase inhibitor into the anteroventral preoptic region attenuates LPS fever, **Journal Physiology**, v. 274, p. R783-R789, 1998.

SCHENKEL, E. P. *et al.* Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. PL; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**, Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC. 3. Ed. , cap. 15, 2000.

SCHOLISH, K.; GEISLINGER, G.. Is mPEGS-1 a promising target for pain therapy?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27 (8), p. 399-401, 2006.

SCHOTANUS K, TILDERS FJ, BERKENBOSCH F. Human recombinant interleukin-receptor antagonist prevents adrenocorticotropin, but not interleukin-6 responses to bacterial endotoxin in rats. **Endocrinology**, 133(6), p. 2461-8, 1993.

SILVA, M. J. M. *et al.* Atividades moluscicida de plantas do nordeste brasileiro II. **Revista Brasileira de Farmácia**. Rio de Janeiro, v. 3, p. 117-123, 1971.

SMIDERLE, F. R. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1 \rightarrow 3),(1 \rightarrow 6)-linked β -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, v. 30, p. 1-6, 2008.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira.**, v. 20, p. 135-142, 2006.

SOUZA, F. R. *et al.* Hypothermic and antipyretic effects of 3-methyl and 3-phenyl-5-hydroxy-5-trichloromethyl – 4 , 5 – dihydro – 1 H - 1-pyrazolcarboxamide induces

- antinociception in mice. **European Journal Pharmacology**, 451: 141-147, 2002.
- STAROWICZ, K.; NIGAM, S.; DI MARZO, V. Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, p. 13–33, 2007
- STITT, J. T. Prostaglandin E1 fever induced in rabbits. **Journal Physiology Londres**, v.232, p.163-179, 1973.
- TAHIRO, M. *et al.* Imaging of histamine H₁ receptors in human brain and impaired cognitive performance induced by second generation antihistamines. **Cyric Annual report**, p. 155-159, 2001.
- THURMOND, R. L. *et al.* The role of histamine H₁ and H₄ receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews**, v. 7, p. 41-53, 2008.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, Netherlands, 51, p. 5-17, 1992.
- TOLEDO, M. I. **Avaliação da Toxicidade da espécie *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger**. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil, 1996.
- TRACEY, D. *et al.* Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, p. 244–279, 2008.
- TRENT M. S. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. **Biochemical Cellular Biology**. V. 82(1), p.71-86, 2004.
- TURNBULL, A.V.; RIVIER, C.L. Sprague-Dawley rats obtained from different vendors exhibit distinct adrenocorticotropin responses to inflammatory stimuli. **Neuroendocrinology**, v. 70, n. 3, p.186-195, 1999.
- TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 289-306, 2006.
- VANE, S. J. Aspirin and other anti-inflammatory drugs. **Thorax**, London, v. 55, sup. 1, p. S3-S9, 2000.
- VANEGAS, H. & SCHAIBLE, HANS-GEORG. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?. **Brain Research Reviews** 46, p. 295-309, 2004.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.
- VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterol Motil**, 20, 73–80, 2008.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Pharmacological characterization of the analgesic response to the sub-plantar injection of serotonin in the rat. **European Journal**

of Pharmacology, v. 164, p. 497-505, 1989.

WAGNER, K. H. Biological relevance of terpenoids overview focusing on mono, di and tetraterpenes. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 47, p. 95-106, 2003.

WOUTERS, M. M. *et al.* 5-HT receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle and enteric nerves. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 5-12, 2007.

YEDGAR, S. *et al.* Treatment of inflammatory diseases by selective eicosanoid inhibition: a double-edged sword? **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 459-464, 2007.

ZAMPRONIO, A.R. *et al.* Involvement of CRH in fever induced by a distinct pre-formed pyrogenic factor (PFPF). **Inflammation Research**, v. 49, p.1-7, 2000.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical of pharmacology**, v. 73, p. 165-174, 2007.

ZEISBERGER, E. From humoral fever to neuroimmunological control of fever. **Journal Thermal Biology**, v.24, p.287-326, 1999.

ZHANG, Y.; YANG, Z.; GAO, X. & WU, G. The role of 5-hydroxytryptamine 1A and 5-hydroxytryptamine 1B receptors in modulating spinal nociceptive transmission in normal and carrageenan-injected rats. **Pain**, 92(1-2), p. 201-211, 2001.

ZHOU, H. Y. *et al.*. Anti-inflammatory activity of 21 (α , β)-methykmelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque. **European Journal of Pharmacology**, 572, p. 239-248, 2007.

ZOCCALI, C. The endothelium as a target in renal diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 20 , p. S39-S44, 2007.