



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SIMONE APARECIDA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS
ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *LYCHNOPHORA PINASTER* (ARNICA)**

OURO PRETO – MG

2010

SIMONE APARECIDA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS
ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO
DE *LYCHNOPHORA PINASTER* (ARNICA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos. Linha de Pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Dênia Antunes Saúde Guimarães

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Grabe Guimarães

OURO PRETO – MG

2010

F383a

Ferreira, Simone Aparecida.

Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* (Arnica) [manuscrito] / Simone Aparecida Ferreira – 2010.

xxvi, 147 f.: il. color., grafs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães.

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Fármacos - Teses. 2. Toxicidade - Teses. 3. Agentes anti-inflamatórios - Teses. 4. Arnica - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 615.099:582.998.16

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

SIMONE APARECIDA FERREIRA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DAS ATIVIDADES ANALGÉSICA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *LYCHNOPHORA PINASTER* (ARNICA)

Esta dissertação foi julgada e aprovada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto.

Prof^ª. Dr^ª Dênia Antunes Saúde Guimarães - UFOP
ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª Andrea Grabe Guimarães - UFOP
CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Elaine Maria de Souza Fagundes - UFMG

Prof^ª. Dr^ª. Neila Márcia Silva Barcellos - UFOP

Ouro Preto, 21 de maio de 2010.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

Sessão de defesa da 25ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da universidade Federal de ouro Preto que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a **SIMONE APARECIDA FERREIRA** com defesa da dissertação intitulada "Avaliação da toxicidade e das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* Mart. (Arnica)" avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 21 de maio de 2010.

Profª. Drª. Elaine Maria de Souza Fagundes
(Departamento de Fisiologia e Biofísica ICB - UFMG)

Profª. Drª. Neila Márcia Silva Barcellos
(DEFAR- UFOP)

Profª. Drª. Dênia Antunes Saúde Guimarães
(Orientadora/DEFAR – UFOP)

Profª. Drª. Andrea Grabe Guimarães
(Co-orientadora- DEFAR-UFOP)

**Este presente trabalho foi realizado sob orientação da
Prof^a. Dr^a. Dênia Antunes Saúde Guimarães e co-orientação da
Prof^a. Dr^a. Andrea Grabe Guimarães**

**Laboratório de Plantas Mediciniais (LAPLAMED)
Laboratório de Farmacologia Experimental
Escola de Farmácia - UFOP**

Este trabalho foi financiado pela CAPES-REUNI, FAPEMIG PROCESSO N°. CDS - APQ-01355-08 e pela Rede TOXIFAR/FAPEMIG. A espécie vegetal foi coletada com autorização do IBAMA.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Maria Aparecida Ferreira e Lúcio Ferreira,
e à minha irmã Cíntia por todo carinho, apoio e incentivo
dedicados a mim. Sei que não mediram esforços para que
mais essa conquista fosse concretizada.

E também agradeço a Deus por ter me proporcionado
conhecer essa pessoa única, verdadeira, amiga,
companheira que amo muito. Meu amado, Cássio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização e concretização desse trabalho, em especial:

À professora Dênia Antunes Saúde Guimarães, pela oportunidade, orientação, paciência, pela confiança depositada em mim e pelo seu constante esforço durante a realização deste trabalho.

À professora Andrea Grabe Guimarães pela convivência agradável, apoio e incentivo nos experimentos *in vivo*.

À professora Carmem Aparecida de Paula pela amizade, pelo apoio e presença constante na realização deste trabalho.

À professora Cláudia Martins Carneiro pela dedicação, convivência, paciência e colaboração nos trabalhos de histopatologia.

À professora Vanessa Carla Furtado Mosqueira pela colaboração no desenvolvimento da formulação utilizada neste trabalho e pela disponibilização dos aparelhos e equipamentos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da Escola de Farmácia da UFOP.

À professora Célia Maria Corrêa pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Síntese de Produtos Naturais da Escola de Farmácia da UFOP.

Ao professor Roney Nicolato pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Escola de Farmácia da UFOP.

Ao professor Sidney Augusto (Bibo) pelos programas de computador e ótimos conselhos.

Aos professores da Escola de Farmácia, pela convivência, incentivo e que contribuíram para minha formação acadêmica.

Ao professor Júlio Antônio Lombardi da UFMG, pela identificação botânica da espécie vegetal.

Aos funcionários da Escola de Farmácia, Adão Júlio (Laboratório de Farmacognosia) pelo constante apoio e amizade e Acácio (Laboratório de Farmacotécnica) pela disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários do Biotério Central por disponibilizarem os animais sempre com presteza, especialmente Cristina e Érica.

Ao funcionário do Biotério da Escola de Farmácia, Wilson, pela amizade, competência e cuidados dedicados aos animais.

Aos funcionários do LAPAC, Cássio Zumerle Masioli e Adão José da Rocha, pelo apoio incondicional, competência, amizade e prontidão em ajudar.

À funcionária Maria Chaves do Laboratório de Imunopatologia da UFOP pela confecção das lâminas histopatológicas.

À Nívia Carolina Nogueira de Paiva pela realização da análise morfométrica e pelo auxílio no entendimento destas análises.

Às amigas do Laboratório de Estudos Químicos e Biológicos de Plantas Medicinais, em especial, Fernanda, Zilma, Patrícia, Arlene, Leidiane, Michele pelas valiosas contribuições para a realização de diversos experimentos e Maíra, Karol pela excelente convivência. Obrigada a todas por terem compartilhado cada momento dessa árdua travessia.

A meus colegas de mestrado e companheiros de luta pela amizade, aprendizado e ótimos momentos vividos.

À amiga Gleici por ter compartilhado momentos de conquistas, frustração e cansaço.

À amiga Tatiana pela convivência fraterna e amizade sincera. Sempre onde estiver levarei você comigo!

Aos meus pais Maria e Lúcio, minha irmã Cíntia e os familiares que sempre foram a minha base, pelo incansável apoio, amor e estímulo em todos os momentos.

Ao meu amor, Cássio. Por me apoiar em todos os momentos da minha vida, me incentivar nos estudos, me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho e por ser meu companheiro nas horas difíceis e nas vitórias conquistadas.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), UFOP e FAPEMIG pelas bolsas de iniciação científica concedidas.

A CAPES-REUNI pela bolsa de mestrado concedida.

E acima de tudo, agradeço a Deus por ter me dado forças para lutar e vencer mais essa etapa de minha vida.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver..."

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	02
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
1.2.1. Gênero <i>Lychnophora</i>	04
1.2.2. Importância fitoterápica da arnica (<i>Lychnophora pinaster</i>).....	17
1.2.3. Características da <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	18
1.2.4. Descrição botânica da espécie vegetal.....	19
1.2.5. Inflamação.....	21
1.2.6. Dor e nocicepção.....	23
1.2.7. Toxicidade.....	25
1.2.7.1 Toxicidade aguda.....	26
1.3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	27
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1.1. Equipamentos.....	31
3.1.2. Reagentes e materiais de consumo.....	32
3.1.3. Kits para análise bioquímica.....	34
3.1.4. Reveladores para cromatografia em camada delgada.....	34
3.1.4.1. Anisaldeído sulfúrico.....	34
3.1.4.2. Reagente de Dragendorff.....	34

3.1.4.3. Reagente para produtos naturais (NP/PEG).....	35
3.1.4.4. Hidróxido de potássio 5%.....	35
3.1.4.5. Reagente de Liebermann-Burchard.....	35
3.1.4.6. Cloreto férrico 2%.....	35
3.1.4.7. Ferrocianeto de potássio 1%.....	35
3.1.4.8. Reagente de Kedde.....	35
3.1.4.9. Ácido sulfúrico a 50% em metanol.....	36
3.2. MATERIAL VEGETAL.....	36
3.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	36
3.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	36
3.4.1. Preparo da amostra.....	36
3.4.1.1. Caracterização de taninos e polifenóis.....	37
3.4.1.2. Caracterização de heterosídeos flavônicos.....	37
3.4.1.3. Caracterização de agliconas flavônicas.....	37
3.4.1.4. Caracterização de heterosídeos antraquinônicos.....	37
3.4.1.5. Caracterização de agliconas antraquinônicas.....	38
3.4.1.6. Caracterização de triterpenos e esteróides.....	38
3.4.1.7. Caracterização de cumarinas.....	38
3.4.1.8. Caracterização de saponinas.....	38
3.4.1.9. Caracterização de heterosídeos cardiotônicos.....	39
3.4.1.10. Caracterização de alcalóides.....	39
3.4.1.11. Caracterização de protoantocianidinas.....	39
3.4.2. Obtenção do perfil cromatográfico por CLAE-FR.....	39
3.4.2.1. Preparo das amostras.....	40
3.4.2.2. Condições cromatográficas.....	40
3.4.3. Fracionamento cromatográfico de LPiE.....	40
3.5. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	41
3.5.1. Animais.....	41
3.5.2. Preparo das soluções do extrato etanólico bruto.....	41
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	42
3.6.1. Preparação do emulgel.....	42
3.6.2. Edema de pata induzido pela injeção subplantar de carragenina.....	43

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	45
3.7.1. Tratamentos.....	45
3.7.2. Teste da placa quente.....	46
3.8. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA.....	47
3.8.1. Tratamento.....	47
3.8.2. Protocolo experimental.....	47
3.8.3. Atividade no sistema nervoso central.....	49
3.8.3.1. Medida da atividade exploratória no teste de campo aberto (Open-field).....	50
3.8.3.2. Método de tração.....	50
3.8.4. Avaliação do consumo médio de água e ração e variação do peso corporal.....	51
3.8.5. Avaliação dos pesos úmidos dos órgãos.....	51
3.8.6. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	52
3.8.7. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	52
3.8.8. Avaliação histopatológica.....	53
3.8.8.1. Preparo do formol para fixação.....	53
3.8.8.2. Desidratação, diafanização e inclusão em parafina.....	53
3.8.8.3. Microtomia.....	54
3.8.8.4. Coloração (Hematoxilina-Eosina).....	54
3.8.8.5. Análise histopatológica.....	54
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	57
4.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO.....	57
4.3. OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-FR	60
4.4. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS.....	63
4.4.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	63
4.4.2. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	71
4.4.3. Avaliação da toxicidade aguda.....	77
4.4.3.1. Atividade locomotora e força muscular.....	79

4.4.3.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	83
4.4.3.3. Avaliação dos parâmetros hematológicos.....	89
4.4.3.4. Avaliação do consumo médio de água e ração e variação do peso corporal.....	92
4.4.3.5. Avaliação dos pesos úmidos dos órgãos.....	97
4.4.3.6. Avaliação histopatológica.....	99
5. CONCLUSÕES.....	108
5.1. CONCLUSÕES GERAIS.....	109
6. PERSPECTIVAS.....	110
6.1. PERSPECTIVAS.....	111
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
7.1. REFERÊNCIAS.....	113
ANEXO.....	147

RESUMO

As *Lychnophoras* (Asteraceae) são espécies nativas do Brasil, popularmente conhecidas como “arnica” e utilizadas na medicina popular em preparações alcoólicas e hidroalcoólicas como analgésicas, anti-inflamatórias, antirreumáticas, contusões e picadas de insetos. A espécie *Lychnophora pinaster* Mart. é uma das mais usadas pela população. Estudos prévios (GUZZO et al., 2008) mostraram a potencial atividade desta espécie. Entretanto, estudos adicionais são necessários para comprovar sua segurança e propriedades terapêuticas. Assim foi escolhida para avaliação da toxicidade aguda e das atividades anti-inflamatória e analgésica.

As atividades anti-inflamatórias tópicas do extrato etanólico e das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica (5% p/p) de *L. pinaster* foram avaliadas pelo método de edema de pata induzido por carragenina. A fração acetato de etila ($\Delta\%$ 17,78 \pm 1,79) apresentou baixa atividade. O extrato etanólico bruto ($\Delta\%$ 12,35 \pm 2,24) e as frações: hexânica ($\Delta\%$ 10,61 \pm 1,53), diclorometânica ($\Delta\%$ 9,77 \pm 1,28) e metanólica ($\Delta\%$ 7,63 \pm 0,79) promoveram redução do edema de pata em comparação aos controles [emulgel base ($\Delta\%$ 36,13 \pm 1,08) e Sham ($\Delta\%$ 3,10 \pm 0,59)] e padrões [diclofenaco (Cataflam®) ($\Delta\%$ 6,92 \pm 0,51) e diclofenaco SIGMA (formulado em emulgel, $\Delta\%$ 5,18 \pm 1,02)], demonstrando boa atividade anti-inflamatória. A fração metanólica foi a mais ativa e teve efeito anti-inflamatório similar ao medicamento cataflam.

O extrato etanólico de *L. pinaster* foi avaliado após a administração oral em camundongos *Swiss* quanto ao efeito antinociceptivo pelo método da placa quente. O extrato na dose de 500 mg/kg apresentou atividade antinociceptiva (19,86 \pm 3,36 s) semelhante ao observado após a administração da morfina (20,63 \pm 3,42 s). A dose de 750 mg/kg apresentou efeito semelhante à dipirona, sendo 10,19 \pm 1,22 s e 12,70 \pm 0,92 s, respectivamente.

Para avaliação da toxicidade aguda, o extrato etanólico bruto foi administrado por via oral nas doses de 125; 250 e 500 mg/kg em camundongos *Swiss*, machos e fêmeas. As três doses administradas não causaram prejuízo motor aos animais, pois não alteraram o tônus muscular destes, mas as doses de 250 e 500 mg/kg causaram sedação sendo que reduziram significativamente a locomoção espontânea no método de campo aberto.

As doses 125; 250 e 500 mg/kg não produziram alterações nas dosagens bioquímicas, hematológicas e no consumo de água e ração de camundongos machos e fêmeas. Com relação ao peso corporal somente os machos apresentaram diferenças significativas no ganho de peso

corporal em relação ao grupo controle. Para o peso relativo dos órgãos houve diferenças estatísticas entre os rins e fígado de machos e fêmeas tratados e o grupo controle.

Na avaliação histopatológica, o extrato provocou alterações celulares nos rins e fígado em todas as doses avaliadas (125; 250 e 500 mg/kg), tais como degeneração vacuolar e inflamação. A análise morfométrica do fígado mostrou que o extrato não possui efeito hepatotóxico dose dependente, mas o efeito observado era maior nas fêmeas do que nos machos.

O trabalho realizado mostrou que as partes aéreas de *L. pinaster* possuem atividade anti-inflamatória e analgésica significativa. As análises de toxicidade mostraram que existem substâncias potencialmente tóxicas ao fígado e aos rins nesta planta, mas que estudos adicionais devem ser realizados para verificar se as alterações são reversíveis e provar que a via oral é ou não indicada para o uso da população.

ABSTRAT

Lychnophoras (Asteraceae) are native plants from Brazil, popularly known as "arnica" and used in folk medicine in alcoholic and hydro-alcoholic preparations for the treatment of bruise, inflammation, pain, rheumatism and for insect bites. The species *Lychnophora pinaster* Mart. it is one of the more used by the population. Previous studies (GUZZO et al., 2008) showed potential activity of this species. However, additional studies are necessary to prove your safety and therapeutic properties. Like this, the species *L. pinaster* was chosen for the acute toxicity and of the anti-inflammatory and analgesic activities evaluation.

The anti-inflammatory topical activities of the ethanolic extract and fractions hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanolic (5% p/p) of *L. pinaster* were evaluated for the method of paw edema induced by carragenina. The ethyl acetate fraction ($\Delta\%$ $17,78 \pm 1,79$) did it present low activity. The crude ethanolic extract ($\Delta\%$ $12,35 \pm 2,24$) and the fractions: hexane ($\Delta\%$ $10,61 \pm 1,53$), dichloromethane ($\Delta\%$ $9,77 \pm 1,28$) and methanolic ($\Delta\%$ $7,63 \pm 0,79$) did they promote reduction of the paw edema in comparison with the controls [emulgel base ($\Delta\%$ $36,13 \pm 1,08$) and Sham ($\Delta\%$ $3,10 \pm 0,59$)] and patterns [diclofenac (Cataflam®) ($\Delta\%$ $6,92 \pm 0,51$) and diclofenac SIGMA (done formulate in emulgel $\Delta\%$ $5,18 \pm 1,02$)], demonstrating good anti-inflammatory activity. The methanolic fraction was the more active and it had similar anti-inflammatory effect to the medicine cataflam.

The ethanolic extract of *L. pinaster* was evaluated after the oral administration in mice *Swiss* with relationship to the antinociceptive effect for the method of the hot plate. The extract in the dose of 500 mg/kg presented antinociceptive activity ($19,86 \pm 3,36$ s) similar to the observed after the administration of the morphine ($20,63 \pm 3,42$ s). The dose of 750 mg/kg presented effect similar to the dipyrone, being $10,19 \pm 1,22$ s and $12,70 \pm 0,92$ s, respectively.

For evaluation of the acute toxicity, the doses of 125; 250 and 500 mg/kg of the crude ethanolic extract were administered to mice *Swiss* orally, males and females. The three administered doses didn't cause motor incoordination to the animals, because they didn't alter the muscular force of these, but the doses of 250 and 500 mg/kg caused sedation and they reduced significantly the spontaneous locomotor activity in the method of open field.

The doses 125; 250 and 500 mg/kg didn't produce alterations in the biochemical and hematological dosages, in the consumption of water and food of male and female mice. With relationship to the corporal weight only the males presented significant differences in the body weight gain in relation to control group. For the relative weight of the organs there were

statistical differences between the kidneys and liver of males and females treated and the group control.

In the evaluation histopathological, the extract provoked cellular alterations in the kidneys and liver in all the evaluated doses (125; 250 and 500 mg/kg), such as vacuolar degeneration and inflammation. The morphometric analysis of the liver showed that the extract doesn't possess hepatotoxic effect dose dependent manner, but the effect observed was larger in the females than in the males.

This work showed that the aerial parts of *L. pinaster* possess anti-inflammatory and analgesic activities significant. The toxicity analyses showed that the plant possesses substances potentially toxicant to the liver and the kidneys, but that additional studies should be accomplished to verify the alterations they are reversible and to prove that the oral route is or non appropriate for the use of the population.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
AMPC	Adenosina monofosfato-cíclico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor (Fator neurotrófico derivado do encéfalo)
CCD	Cromatografia em camada delgada
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclooxigenase
CYP-450	Citocromo - P450
DAG	Diacylglicerol
DL ₅₀	Dose letal 50% (quantidade de uma determinada substância que é necessária ser ingerida ou administrada para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo).
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
D ₇	Após 7 dias da administração do extrato LPiE
D ₁₄	Após 14 dias da administração do extrato LPiE
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
e.p.m	Erro padrão da média
FAPs	Fibras aferentes primárias
FDA	Food and Drug Administration
GMPc	Guanosina monofosfato-cíclico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
HETE	Ácido hidroxitetraenóico
HPLC	High performance liquid chromatography
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IC ₅₀	Concentração de uma droga que seja requerida para a inibição de 50% de uma reação.
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Via intraperitoneal
IP ₃	Inositol trifosfato
LDL	Low density lipoproteins (lipoproteína de baixa densidade)
LOX	Lipooxigenase
LPiA	Fração acetato de etila de <i>L. pinaster</i>
LPiD	Fração diclorometânica de <i>L. pinaster</i>
LPiE	Extrato etanólico bruto de <i>L. pinaster</i>

LPiH	Fração hexânica de <i>L. pinaster</i>
LPiM	Fração metanólica de <i>L. pinaster</i>
LSTs	Lactonas sesquiterpênicas
LTs	Leucotrienos
NADP	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NO	Óxido nítrico
NP	Difenilboriloxietilamina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Platelet activating factor (Fator de ativação plaquetária)
PEG	Polietileniglicol
PGs	Prostaglandinas
P-gP	Glicoproteína-P
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PMN	Polimorfonucleares
p.o.	via oral
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
TNF- α	Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral- α)
TR	Tempo de retenção
TXs	Tromboxanos

UV	Ultravioleta
VCM	Volume corpuscular médio
VRL	Receptor vanilóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Substâncias registradas entre 1991 e 2006.....2

Figura 1.2 - Mecanismo da adição tipo Michael envolvendo a reação de um grupamento sulfidríla de um aminoácido em γ -lactonas com metileno exocíclico em α à carbonila em pH alto- escala fisiológica.....5

Figura 1.3 - *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae). (A) indivíduo adulto no habitat natural; (B) flores.....19

Figura 1.4 - (A) Capítulos com aquênios sem o papus interno, já em dispersão. (B) Aquênio sem papus interno aderido.....20

Figura 1.5 - (A) Capítulos com aquênios com papus interno presente (B) Aquênio com papus interno aderido.....21

Figura 3.1 - Aplicação de carragenina na região subplantar.....43

Figura 3.2 - Delineamento experimental para a avaliação da atividade anti-inflamatória pelo modelo de indução de edema por carragenina em camundongos.....44

Figura 3.3 - Vias de administração dos padrões, controle e extratos. (A) Via oral; (B) Injeção intraperitoneal.....45

Figura 3.4 - Camundongo sobre a placa aquecida a $56 \pm 1^\circ\text{C}$, lambendo uma das patas.....46

Figura 3.5 - Delineamento experimental para a avaliação da atividade antinociceptiva pelo método da placa quente em camundongos.....47

Figura 3.6 - Delineamento experimental para a avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*.....49

Figura 3.7 - (A) e (B) - Camundongo no campo aberto.....50

Figura 3.8 - Camundongo no aparelho de tração.....51

Figura 4.1 - Obtenção do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *L. pinaster*.....57

Figura 4.2 - Estruturas que coexistem em equilíbrio no meio ácido.....58

Figura 4.3 - Cromatograma do extrato etanólico bruto (LPiE) de *L. pinaster* (*fingerprint*)....61

Figura 4.4 - Cromatograma representando o perfil de LPiE, padrão ácido caféico, padrão ácido clorogênico, padrão vitexina e padrão quercetina em CLAE-FR e espectros no UV.....62

Figura 4.5 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos machos após 7 dias da administração de uma única dose.....95

Figura 4.6 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos machos após 14 dias da administração de uma única dose.....95

Figura 4.7 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos fêmeas após 7 dias da administração de uma única dose.....96

Figura 4.8 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos fêmeas após 14 dias da administração de uma única dose.....96

Figura 4.9 - Fotomicrografias de secções de rim de camundongos *Swiss* submetidos à avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE).....102

Figura 4.10 - Fotomicrografias de secções de fígado de camundongos *Swiss* submetidos à avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE).....103

Figura 4.11 - Análise morfométrica do processo inflamatório no fígado de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com veículo ou diferentes doses de extrato etanólico bruto de *L. pinaster* acompanhados até o 7º ou 14º dias após a administração dos extratos.....105

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR.....40

Tabela 3.2 - Frações de *L. pinaster* obtidas da coluna de filtração de LPiE.....41

Tabela 4.1 - Identificação qualitativa dos metabólitos secundários do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* Mart.....59

Tabela 4.2 - Comparação entre os tempos de retenção (TR) das substâncias utilizadas como padrões e aqueles observados no extrato etanólico bruto (LPiE) de *L. pinaster*.....62

Tabela 4.3 - Variação percentual (%) da espessura das patas dos animais após injeção de carragenina ou introdução da agulha na pata (sham) e tratamento tópico.....65

Tabela 4.4 - Variação do tempo em que os camundongos gastam para lambe a (s) pata (s) comparando-se diferentes doses do extrato etanólico bruto e padrões com o controle.....74

Tabela 4.5 - Efeito do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* sobre o número de quadrados percorridos pelos animais em 5 min no campo aberto.....81

Tabela 4.6 - Efeito do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* sobre o número de vezes que os animais se apóiam apenas sobre as patas posteriores durante 5 min no campo aberto.....81

Tabela 4.7 - Efeito do extrato etanólico de *L. pinaster* sobre a força muscular dos animais pelo método de tração.....82

Tabela 4.8 - Parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* tratados com extrato etanólico bruto de *L. pinaster* por via oral em dose única.....84

Tabela 4.9 - Efeito da administração oral aguda, em dose única, do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* nos parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*.....91

Tabela 4.10 - Consumo médio de ração por camundongo que recebeu o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* em dose única.....92

Tabela 4.10.1 - Camundongos machos acompanhados até o 7º dia após a administração do extrato.....92

Tabela 4.10.2 - Camundongos fêmeas acompanhadas até o 7º dia após a administração do extrato.....92

Tabela 4.10.3 - Camundongos machos acompanhados até o 14º dia após a administração do extrato.....93

Tabela 4.10.4 - Camundongos fêmeas acompanhadas até o 14º dia após a administração do extrato.....93

Tabela 4.11 - Consumo médio de água por camundongo que recebeu o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* em dose única.....93

Tabela 4.11.1 - Camundongos machos acompanhados até o 7º dia após a administração do extrato.....93

Tabela 4.11.2 - Camundongos fêmeas acompanhadas até o 7º dia após a administração do extrato.....93

Tabela 4.11.3 - Camundongos machos acompanhados até o 14º dia após a administração do extrato.....94

Tabela 4.11.4 - Camundongos fêmeas acompanhadas até o 14º dia após a administração do extrato.....94

Tabela 4.12 - Relação entre os pesos dos órgãos e o peso corpóreo de camundongos acompanhados até o 7º e 14º dias após a administração do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em dose única.....98

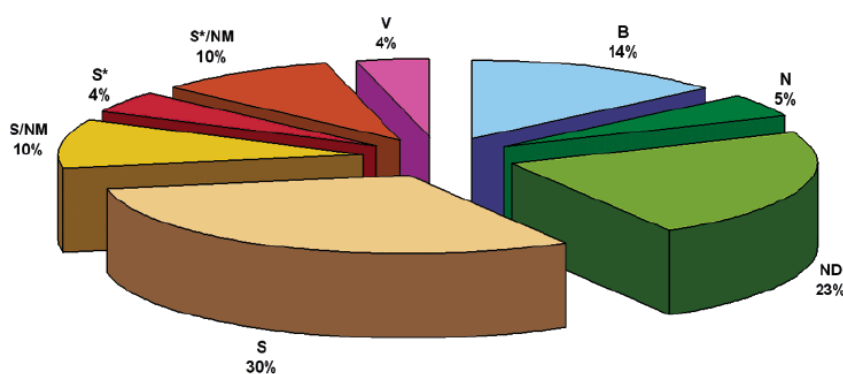
Tabela 4.13 - Frequência de núcleos celulares por área ($1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) no fígado de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com veículo ou diferentes doses de extrato etanólico bruto de *L. pinaster* acompanhados até o 7º ou 14º dias após a administração dos extratos.....104

1. INTRODUÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). A maior potencialidade econômica da biodiversidade está associada à descoberta de novos biomateriais e novos medicamentos derivados diretamente ou sintetizados a partir de recursos biológicos (BRAGA, 2002).

Segundo Newman e colaboradores, 2007, no período de 1981 a 2006, foram registradas 1184 novas substâncias químicas, sendo que 70% são de origem natural. Nesse percentual estão incluídas as substâncias de origem vegetal, demonstrando que produtos naturais ocupam um papel dominante na descoberta de protótipos para o desenvolvimento de drogas no tratamento de doenças humanas (Figura 1.1).



Legenda

B	Biológico
N	Produto Natural
ND	Derivado de Produto Natural
NM	Produto que mimetiza o natural
S	Droga totalmente sintética
S*	Sintetizada tendo como modelo um produto natural
V	Vacina

Figura 1.1 – Substâncias registradas entre 1991 e 2006
(NEWMAN et al., 2007)

A importância e a potencialidade química das plantas medicinais podem ser identificadas com dados obtidos em pesquisas científicas, onde se constatou que 25% dos medicamentos prescritos em todo mundo, originam-se de plantas, sendo 121 substâncias ativas utilizados de modo geral (RATES, 2001). De 252 medicamentos considerados como

básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente obtidos de plantas medicinais e um número significativo são fármacos sintetizados tendo como protótipos moléculas naturais (RATES, 2001; RASKIN et al., 2002). Aproximadamente 80% da população mundial utilizam a medicina tradicional nos cuidados básicos de saúde, a maioria envolvendo uso de extrato de plantas ou compostos ativos isolados das mesmas (SARDESAI, 2002). Isso significa que 3,5 a 4,0 bilhões de pessoas dependem de plantas como fontes de drogas (FARNSWORTH, 1997).

Ainda segundo a OMS, 2002-2005, as práticas da medicina tradicional expandiram-se globalmente na última década e ganharam popularidade. São incentivadas não somente pelos profissionais que atuam na rede básica de saúde dos países em desenvolvimento, mas também naqueles onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local.

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 22 bilhões por ano (PINTO et al., 2002). O segmento de fitoterápicos brasileiro faturou, no período de novembro de 2003 a outubro de 2006, R\$ 1.840.228.655 (FREITAS, 2007). Este valor refere-se somente aos fitoterápicos industrializados, não correspondendo ao mercado total de produtos obtidos de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2007). A cifra brasileira é pequena se comparada aos valores faturados pela Europa e Estados Unidos, o equivalente a 8,5 e 6,6 bilhões de dólares, respectivamente, sendo a Alemanha o maior mercado mundial (PINTO et al., 2002; SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

Existem na Terra cerca de 350.000 a 550.000 espécies de plantas, (GUERRA & NODARI, 2004). Aproximadamente, 2/3 da diversidade biológica do mundo encontra-se nos trópicos, principalmente em países em desenvolvimento (VIEIRA, 1999). O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade do planeta, contando com mais de 55.000 espécies vegetais, 22% do total registrado no planeta (PINTO et al., 2002). Somente 8% da flora nativa foram estudadas na busca de compostos bioativos e 1.100 avaliadas quanto as suas propriedades medicinais (DIAS, 1996, apud GUERRA & NODARI, 2004).

O Cerrado (também chamado de savana brasileira) é o segundo maior bioma brasileiro após a Floresta Amazônica. Ocupa uma área de aproximadamente 25% do território nacional (VIEIRA & MARTINS, 1998). Sua vasta extensão, aliada ao contato e conseqüente troca de espécies com outros biomas, propiciam ao Cerrado uma alta biodiversidade, estimada atualmente em 1/3 da biota brasileira e 5% da fauna e flora mundiais (ALHO & MARTINS 1995).

Nos últimos anos a flora do Cerrado tem despertado interesse de muitos setores da indústria, em particular do ramo farmacêutico. A descoberta de novos e importantes princípios bioativos no Cerrado tem provocado um aumento no extrativismo das plantas ditas medicinais, e com isso acelerado o processo de extinção de muitas destas espécies. Este fato vem chamando a atenção para a necessidade de estudos preconizando-se alternativas de recuperação e conservação dos recursos naturais, antes que muitas destas espécies desapareçam sem terem sido estudadas (MELO, 2006).

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1. Gênero *Lychnophora*

O gênero *Lychnophora* pertence à subtribo *Lychnophorinae* da família Asteraceae (ROBINSON, 1999). As espécies do gênero *Lychnophora* apresentam um grande número de endemismos, sendo a maioria de suas espécies encontradas nos chamados campos rupestres do Brasil, nos estados de Goiás, Bahia e, principalmente em Minas Gerais. Os campos rupestres são ambientes geralmente com topografia acidentada, clima e solos secos. (GIULIETTI & PIRANI, 1988).

As espécies do gênero *Lychnophora* são tipicamente brasileiras (BOHLMANN & JAKUPOVIC, 1990) e muito conhecidas na medicina popular como “arnica”, “falsa arnica”, “candeia” ou “arnica da serra” devido ao odor semelhante à arnica européia (CERQUEIRA et al., 1987; OLIVEIRA et al., 1996). Elas são utilizadas na medicina popular como preparações alcoólicas e hidroalcoólicas, embebidas em álcool ou cachaça, como analgésicas, anti-inflamatórias, antirreumáticas, contusões e picadas de insetos (CERQUEIRA et al., 1987; OLIVEIRA et al., 1996; SAÚDE et al., 1998; LOPES, 2001).

Estudos fitoquímicos demonstraram que o gênero *Lychnophora* acumula triterpenóides, derivados dos sesquiterpenos cariofileno e α -humuleno, flavonóides, lactonas sesquiterpênicas. Também foram detectados açúcares, taninos, esteróides, lignanas, poliacetilenos, fenilpropanóides (ácidos cafeoilquínicos), ácidos graxos de cadeia longa e seus ésteres (BOHLMANN et al., 1981; CUNHA, 1994; BAZON et al., 1997; BORELLA et al., 1998; BORSATO et al., 2000; JORDÃO, 2003; GRAEL et al., 2005; SANTOS et al., 2005; GOBBO-NETO et al., 2008).

As lactonas sesquiterpênicas (LSTs) são consideradas marcadores químicos da família Asteraceae, de onde a grande maioria de substâncias com enorme variedade estrutural foi isolada (SEAMAN, 1982). Elas são conhecidas por possuírem uma ampla variedade de atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas são antibacterianas, principalmente contra bactérias Gram-positivas (GIESBRECHT et al., 1990; MIGUEL et al., 1996; SAÚDE et al., 2002) antifúngicas (TOWERS et al., 1977; BARRERO et al., 2000), tripanossomicida (CHIARI et al., 1991; 1996; DUARTE, 1993; OLIVEIRA et al., 1996; JORDÃO et al., 2004; GRAEL et al., 2005), antitumoral (LEE et al., 1977; WOERDENBAG et al. 1994), citotóxica (KUPCHAN et al., 1971; LE QUESNE et al., 1976; CANALLE et al., 2001; SCOTTI et al., 2007), antimalárica (FRANÇOIS et al., 1996; LANG et al., 2002), esquistossomicida (VICHNEWSKY et al., 1976; JISAKA et al., 1992; BARTH et al., 1997), antiúlcera (SILVA, 2002), cardiotônica (ROBLES et al., 1995), antinociceptiva (VALÉRIO et al., 2007; AKKOL et al., 2009), anti-inflamatória (HALL et al., 1979; ABAD et al., 1994, LYSS et al., 1997; KLASS et al., 2002).

Estas atividades são mediadas quimicamente pela presença do grupo α -metileno- γ -lactona e também por carbonilas α,β -insaturadas, ésteres conjugados e grupamentos epóxidos em sua estrutura. (PICMAN, 1986; FISHER, 1991; BRUNETON, 2001). Estes grupos funcionais atuam como sítios reativos para nucleófilos biológicos, principalmente grupos tiol e amínicos presentes no sítio ativo de diversas enzimas (fosfofrutoquinase, glicogênio sintase, etc) e resíduos sulfidríla de cisteína da DNA polimerase que serão alquilados irreversivelmente por meio da reação de adição tipo Michael, conforme Figura 1.2 (KUPCHAN et al., 1970; PICMAN, 1986; FISHER, 1991; RÜNGELER et al., 1999; SCHIMIDT et al., 1999; BRUNETON, 2001).

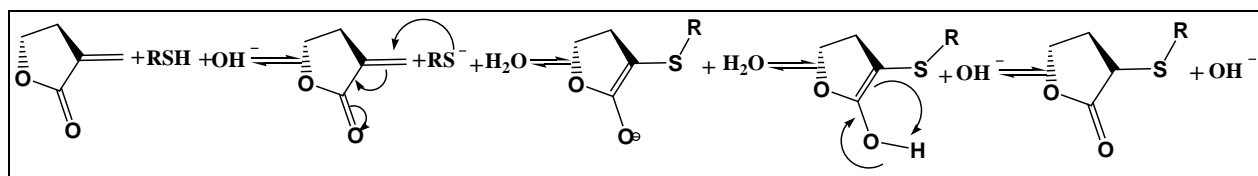
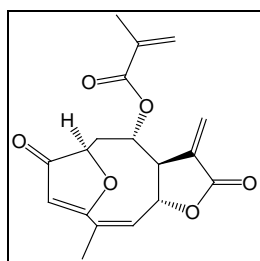


Figura 1.2 - Mecanismo da adição tipo Michael envolvendo a reação de um grupamento sulfidríla de um aminoácido em γ -lactonas com metileno exocíclico em α à carbonila em pH alto-escala fisiológica (Adaptado de SCHIMIDT et al., 1999).

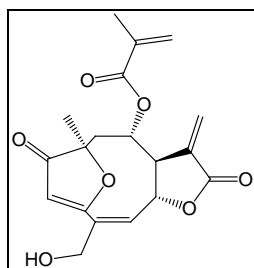
As possibilidades alquilantes das LSTs levaram a diversos estudos de citotoxicidade e de atividade antitumoral, devido à habilidade das lactonas em inibir a síntese do DNA, característica comum às duas atividades (PICMAN, 1986).

A forte atividade citotóxica das LSTs parece estar correlacionada com a defesa de plantas contra herbívoros (SCHMIDT, 1999; PICMAN, 1986). As áreas de ocorrência do gênero *Lychnophora* podem estar relacionadas à alta irradiação de luz ultravioleta, a uma alternância entre períodos de seca e chuva, e periodicidade de ocorrência de queimadas. A co-evolução destas plantas com tais características peculiares, assim como com herbívoros, certamente levaram ao estabelecimento de mecanismos de proteção contra os efeitos deletérios das condições ambientais estressantes, o que pode estar relacionado à produção de compostos citotóxicos e pigmentos protetores de UV, tais como LSTs e flavonóides, respectivamente (PICMAN, 1986; WATERMANN & MOLE, 1994; SCHMIDT, 1999a; CHICARO et al., 2004). Estudo fitoquímico do extrato etanólico da espécie *L. passerina* levou ao isolamento de duas LSTs, 15-desoxigoiazensolido (**1**) e goiazensolido (**2**) e de cinco flavonóides, entre eles: kaempferol (**3**), apigenina (**4**), luteolina (**5**), quercetina (**6**) e tilirosídeo (**7**). Neste estudo verificou-se que a quercetina e o kaempferol, presentes no extrato etanólico, apresentavam atividade antioxidante e por isso protegiam contra raios UV. Além disso, as duas lactonas encontradas nesta espécie reforçam a importância dessa classe de substâncias como marcadores taxonômicos do gênero *Lychnophora* (CHICARO et al., 2004).

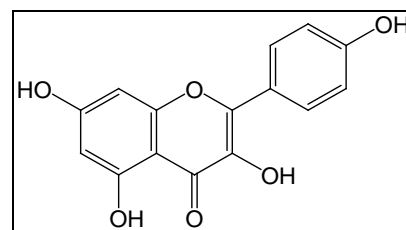
Os flavonóides são substâncias químicas polifenólicas também encontradas em *Lychnophoras*. Possuem uma ampla atividade biológica, tais como: antibacteriana, antiviral, antialérgica, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, antidiabética, antiúlcera, hormonal, antitrombótica e possui efeitos vasoprotetores. (COOK & SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBORNE & WILLIAMS, 2000).



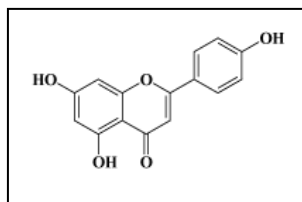
15-desoxigoiazensolido (1)



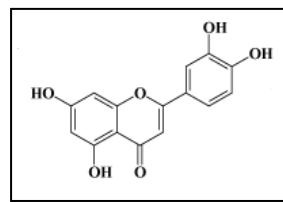
Goiazensolido (2)



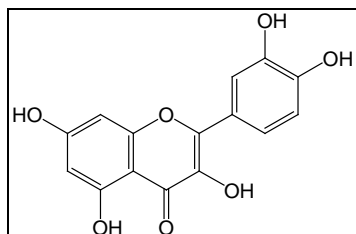
Kaempferol (3)



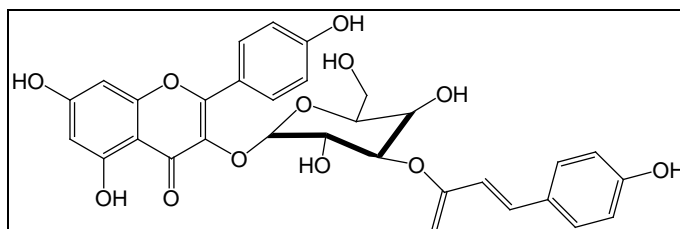
Apigenina (4)



Luteolina (5)



Quercetina (6)



Tilirosídeo (7)

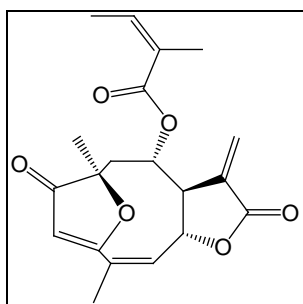
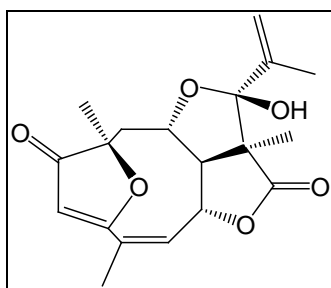
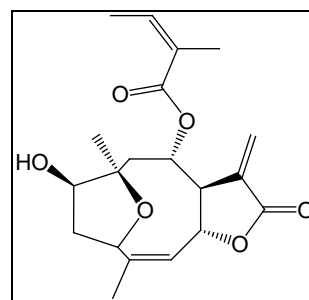
Kanashiro e colaboradores, 2004, demonstraram que oito flavonóides das espécies *L. granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho, *L. salicifolia* Mart. e *L. ericoides* Mart. foram capazes de inibir a formação de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos, estimulado por dois tipos de imunocomplexos em coelhos, e que essa ação foi altamente dependente da estrutura dos flavonóides.

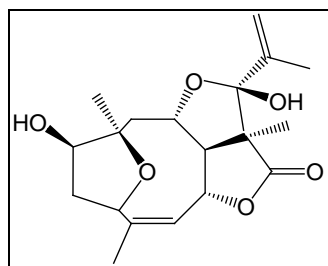
Várias espécies da família Asteraceae possuem atividade antioxidante descrita e podem ser consideradas fontes promissoras de novos fármacos (AVALLONE et al., 2000). Extratos etanólicos brutos e frações de seis espécies de *Lychnophoras* (espécies *L. trichocarpha*, *L. pinaster*, *L. passerina*, *L. staavioides*, *L. ericoides* e *Lychnophoriopsis candelabrum*) foram estudados quanto à atividade antioxidante, utilizando o radical livre DPPH. A espécie que se mostrou mais ativa para o teste de atividade antioxidante foi a *Lychnophora passerina*, com uma IC₅₀ de 78,7 µg/mL (FERRAZ-FILHA, 2008). Ferrari, 2008, testou também a atividade antioxidante para os extratos, frações e substâncias isoladas de *L. trichocarpha* na concentração de 100 µg/mL. Os extratos etanólicos brutos desta espécie apresentaram excelente atividade antioxidante de 94%.

Ferraz Filha e colaboradores, 2006, revelaram que as espécies *Lychnophoriopsis candelabrum*, *Lychnophora passerina*, *L. pinaster*, *L. ericoides*, *L. staavioides* e *L. trichocarpha* possuem uma alta atividade inibitória da xantina oxidase, enzima ativa no mecanismo patofisiológico da doença chamada gota, indicando o potencial destas espécies para o tratamento da gota e como fonte de substâncias com atividade antiartrite gotosa. Ferrari, 2008, também realizou estudos *in vitro* com a espécie *L. trichocarpha* e encontrou alta atividade inibitória da xantina oxidase na fração acetato de etila (77%) e no extrato

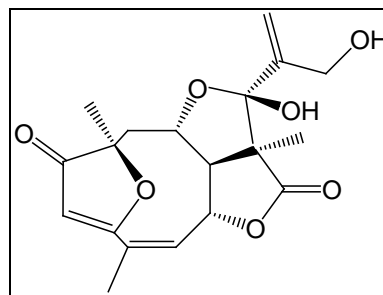
etanólico bruto (64%). Já para as substâncias isoladas não foi detectada atividade significativa, sugerindo que exista um sinergismo entre as mesmas.

Os furanoelíngolidos licnofolido (**8**) e eremantolido C (**9**) extraídos do extrato etanólico das partes aéreas de *L. trichocarpa* Spreng. (SAÚDE et al., 1998) e seus derivados foram avaliados contra as bactérias *Enterococcus faecalis* S48, *Bacillus subtilis* CECT 397, *Staphylococcus aureus* ATCC 8, *Salmonella thyphymurium* LT2, *Escherichia coli* U9 e *Proteus sp.* As lactonas sesquiterpênicas licnofolido (**8**), seu derivado 1 β -hidroxi-2,3-diidrolicnofolido (**10**) e os derivados do eremantolido C (**9**), 1 β -hidroxi-2,3-diidroeremantolido C (**11**) e 3'-hidroxieremantolido C (**12**) apresentaram atividade antibacteriana (SAÚDE et al., 2002). Miguel e colaboradores, 1996, demonstraram a atividade antimicrobiana do ácido acetil licnofóico (**13**) isolado do extrato etanólico das folhas e tronco de *L. salicifolia* e Maciel, 2002, demonstrou a atividade antibacteriana do óleo essencial de *L. ericoides*, *in vitro*, contra bactérias Gram-positivas, principalmente o *Streptococcus*. Relatos de que extratos de *L. ericoides* preparados em diferentes épocas do ano possuíam atividades diferentes motivaram o estudo da variação sazonal das folhas dessa espécie. Através de uma metodologia analítica por CLAE, utilizando padrões majoritários previamente isolados, observou-se o máximo de produção de metabólitos secundários durante a floração no mês de fevereiro (FLAUSINO & LOPES, 2000).

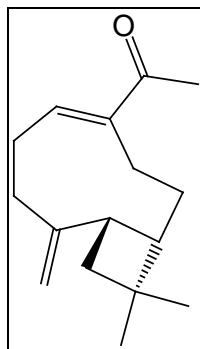
Licnofolido (**8**)Eremantolido C (**9**)1 β -hidroxi-2,3-diidrolicnofolido (**10**)



1-hidroxi-2,3-diidroeremantolido C (11)



3'-hidroxieremantolido C (12)



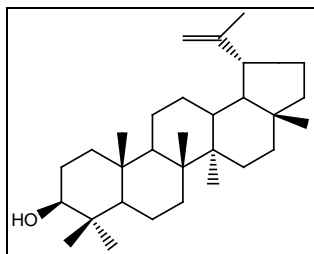
Ácido acetil licnofóico (13)

A espécie *L. markgravii* G. M. Barroso foi incluída no gênero *Lychnophora* (BARROSO, 1956), mas excluída do gênero por Coile e Jones, 1981. Robinson, 1999, em seu estudo do gênero e classificação da subtribo *Vernoniaeae*, incluiu novamente *L. markgravii* ao gênero *Lychnophora*.

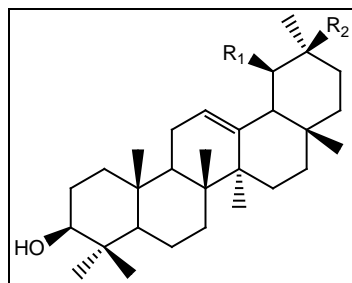
Do extrato diclorometânico das raízes de *L. markgravii* foram isoladas diversas substâncias dentre elas triterpenos como lupeol (14), α e β - amirina (15 e 16); esteróides como estigmasterol (17) e β -sitosterol (18) e lactonas sesquiterpênicas como 15-desoxigoiazensólido (1) e 8-tiglinoiloxigoiazensólido (19). Do extrato diclorometânico das partes aéreas foram isolados flavonóides como pinostrobrina (20), tectocrisina (21) e pinocembrina (22). Do extrato etanólico foi isolado o tilirosídeo (7) (SARTORI et al., 2002).

Lychnophora candelabrum foi recentemente transferida para o gênero *Lychnophoriopsis* devido ao fato desta espécie não apresentar LSTs, que são os marcadores químicos do gênero *Lychnophora*, na sua composição química. No estudo realizado, foram isoladas várias substâncias tais como os triterpenóides lupeol (14), α -amirina (15), β -amirina (16), os flavonóides 3,5,4'-triidroxi-7-metoxiflavona (ramnocitrina ou kaempferol-7-metiléter) (23) (SAKAKIBARA et al., 1976), 3,5-diidroxi-7-metoxiflavona (isalpina ou galangina-7-metiléter) (24) (MABRY et al., 1970), 5,7-diidroxi-7-metoxiflavona (pinocembrina) (22) (JAIPETCH et al., 1982), 3,5,7-triidroxilflavona (galangina) (25) (AFOLAYAN & MEYER,

1997), 3-acetoxi-5,7-diidroxiflavanona (3-acetato de pinobanksina) (26) (BAZON et al., 1997) e 4'-metoxi-5,7-dihidroxiflavona (acacetina) (27) (MABRY et al., 1970; SANTOS et al., 2004).

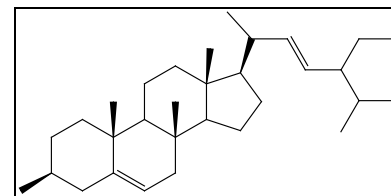


Lupeol (14)

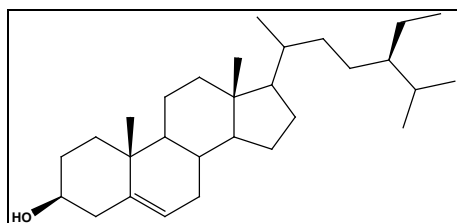


α -amirina (R_1 :Me; R_2 :H) (15)

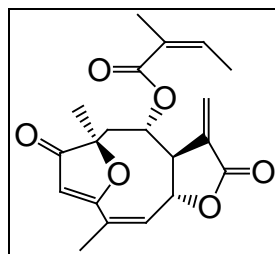
β -amirina (R_1 :H; R_2 :Me) (16)



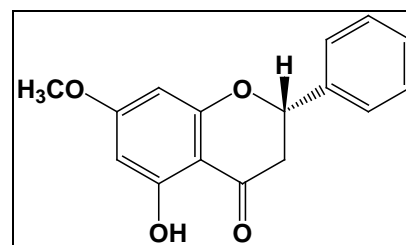
Estigmasterol (17)



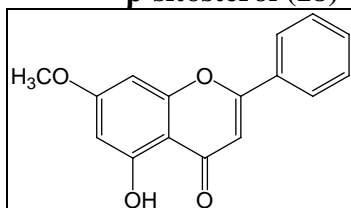
β -sitosterol (18)



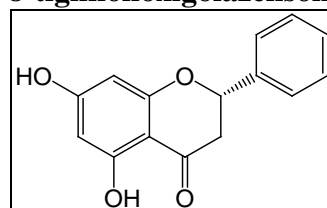
8-tigloiloxigoiazensolido (19)



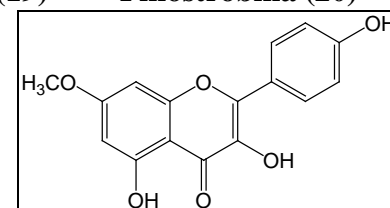
Pinostrobin (20)



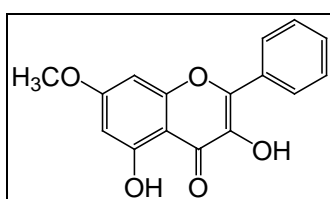
Tectocrisina (21)



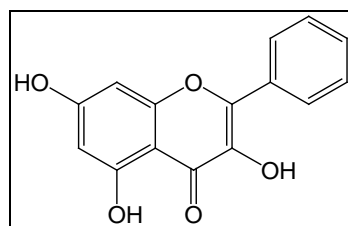
Pinocembrina (22)



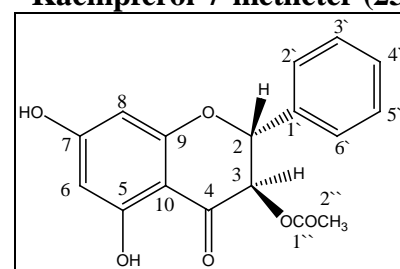
Kaempferol-7-metiléter (23)



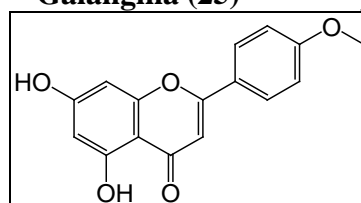
Isalpin (24)



Galangina (25)



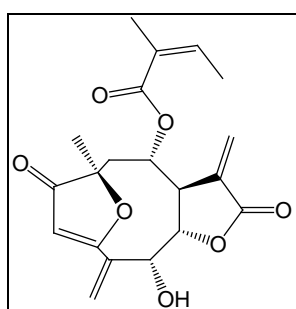
pinobanksina-3-O-acetato (26)



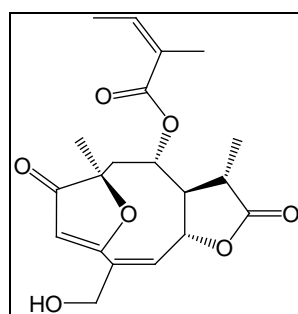
Acacetina (27)

Estudos realizados com 55 espécies vegetais da família Asteraceae, visando obter substâncias com atividade tripanossomicida levaram a onze espécies ativas. Dessas, *L.*

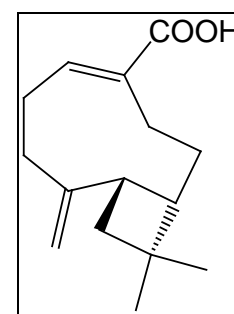
villosissima Mart., *L. passerina* (Mart. ex. DC) Gardn, *L. pinaster* Mart.e *L. trichocarpha* Spreng. já tiveram seus estudos fitoquímicos realizados (TAVARES, 1990; OLIVEIRA et al., 1996; CHIARI et al., 1991 e 1996). Dentre outros constituintes químicos isolados destas quatro espécies, destacam-se as LSTs: 15-desoxigoiazensolido (1), goiazensolido (2), licnofolido (8), eremantolido C (9), isocentraterina (28) e licnoforolido A (29). O goiazensolido (2), obtido de *L. passerina* (Mart ex. DC) Gardn. foi 100% ativo na concentração de 240 µg/mL. O licnofolido (8), que inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas na concentração de 150 µg/mL e o eremantolideo C (9), 100% ativo na concentração de 3600 µg/mL, foram isolados de *L. trichocarpha* Spreng. (OLIVEIRA et al., 1996; SAÚDE et al., 1998). De *L. pinaster* Mart. isolou-se o ácido licnofóico (30), que inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas na concentração de 12 µg/mL (OLIVEIRA et al., 1996).



Isocentraterina (28)

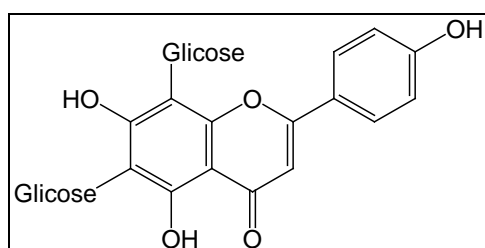


Licnoforolido A (29)

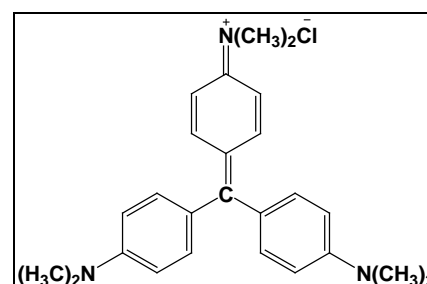


Ácido licnofóico (30)

Grael e colaboradores, 2005, isolaram sete substâncias ativas contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* a partir de extratos de *Lychnophora pohlii* Baker (Asteraceae). Do extrato metanólico, foram isolados os flavonóides luteolina (5) e vicenina-2 (31). Esses flavonóides demonstraram atividade tripanossomicida significativa na concentração de 500 µg/mL. Por comparação, essas substâncias foram menos ativas que a violeta de genciana (32) (IC₅₀ 76 µmol/L e 31 µg/mL respectivamente).

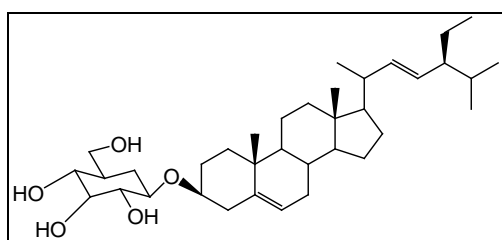


Vicenina-2 (31)

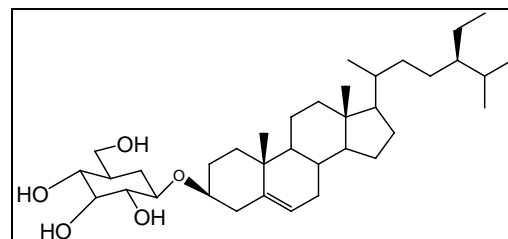


Violeta de Genciana (32)

L. gardneri Sch. Bip. é encontrada em Minas Gerais, normalmente lado a lado com *L. pohlii* Baker, a qual se assemelha muito. O extrato diclorometânico de suas partes aéreas promoveu atividade tripanossomicida significativa. Quase todas as frações apresentaram porcentagens de lise estatisticamente significativas, sendo que algumas destas promoveram lise total de parasitas. Da espécie *L. gardneri* foram isoladas as LSTs, 15-desoxigoiazensolido (**1**) e licnofolido (**8**), uma mistura de duas saponinas denominadas estigmasteril-3- β -D-glicopiranosídeo (**33**) e β -sitosteril-3- β -D-glicopiranosídeo (**34**). A alta taxa de lise parasitária pode estar relacionada à presença destas substâncias (JORDÃO et al., 2000).

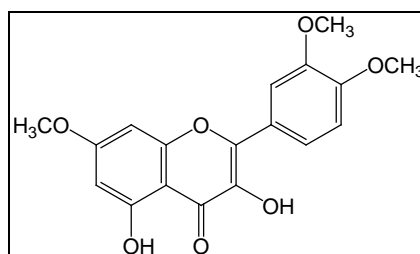


Estigmasteril-3- β -D-glicopiranosídeo (33)



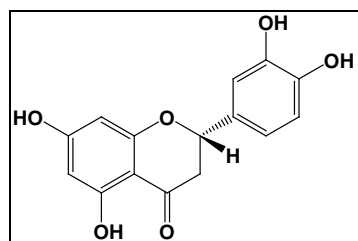
β -sitosteril-3- β -D-glicopiranosídeo (34)

Dos extratos em acetato de etila de *L. salicifolia* Mart, foram isolados flavonóides como 7,3',4'-trimetilquercetina (**35**) e LST como o ácido licnofóico (**30**), que apresentam atividade tripanossomicida (JORDÃO et al., 1997).

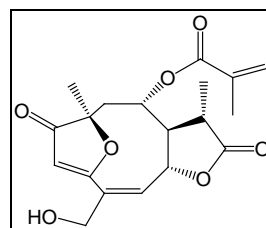


7,3',4'-trimetilquercetina (35)

O estudo fitoquímico do extrato acetato de etila de partes aéreas de *L. granmongolense* (Duarte) Leitão Filho e Semir, 1979, levou ao isolamento de três substâncias tripanossomicidas, o flavonóide eriodictiol (**36**) e as LSTs goiazensolido (**2**) e licnoforolido A (**29**). Outros flavonóides e a lactona sesquiterpênica licnoforolido B (**37**) também foram isolados, mas não mostraram atividade tripanossomicida. Atividade analgésica não foi observada para esse extrato (GRAEL et al., 2000).

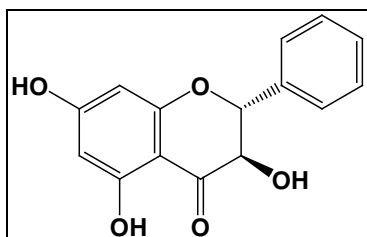


Eriodictiol (36)

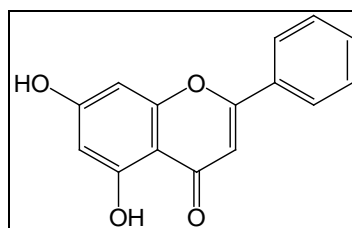


Licnoforolido B (37)

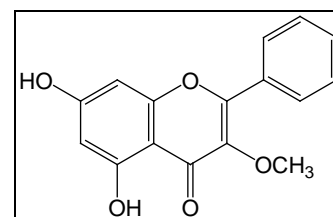
O extrato de *Lychnophora staavioides* Mart. (Asteraceae) forneceu os flavonóides: tectocrisina (21), pinostrobrina (20), pinobanksina (38), 3-acetato de pinobanksina (26), pinocembrina (22), crisina (39), galangina-3-metiléter (40), 3-metilquercetina (41), crisoeriol (42) e vicenina-2 (31) que foram testados contra o *T. cruzi*. A substância mais ativa foi a 3-metilquercetina (41), que não causou lise de células sanguíneas e mostrou-se promissora para uso contra *T. cruzi* em bancos de sangue. Esta substância apresentou uma porcentagem de atividade tripanossomicida de $63,2 \pm 4,1\%$, já a tectocrisina (21) demonstrou $38,5 \pm 8,3\%$ e o crisoeriol (42) $32,7 \pm 7,1\%$ de redução dos parasitas sanguíneos. Todas estas substâncias foram ativas na dose de $500 \mu\text{g/mL}$ (TAKEARA et al., 2003).



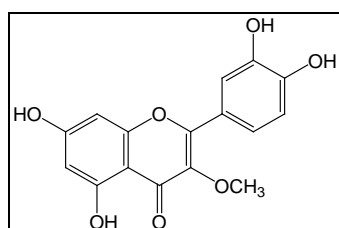
Pinobanksina (38)



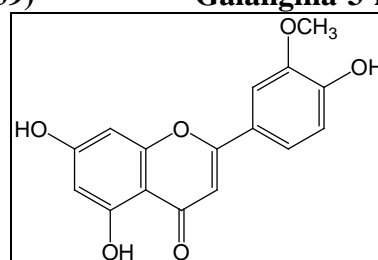
Crisina (39)



Galangina-3-metiléter (40)



3-metilquercetina (41)

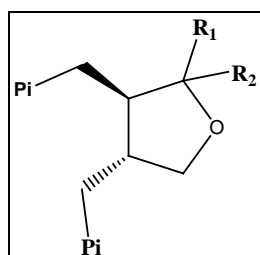


Crisoeriol (42)

Por ser facilmente encontrada em grande parte do território brasileiro, é possível afirmar que a *L. ericoides* Gardn. é a espécie mais utilizada no Brasil. Pequenas empresas vendem extratos alcoólicos e hidroalcoólicos de suas folhas, inflorescências e raízes para fins analgésicos, anti-inflamatórios e cicatrizantes (BORSATO et al., 2000; LOPES, 2001; SANTOS et al., 2005), entretanto desconhece-se qualquer tipo de registro nos órgãos

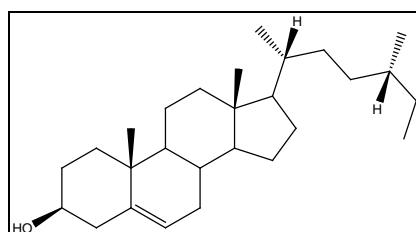
competentes. Porém, o uso indiscriminado, e certas vezes predatório, tornou-a uma espécie da flora brasileira ameaçada de extinção (BIODIVERSITAS, 2007).

O extrato diclorometano das raízes de *L. ericoides* mostrou atividade analgésica significativa pelo modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. As substâncias responsáveis por esta atividade foram as lignanas: cubebina (α (43) e β (44)) e metil-cubebina (α (45) e β (46)) (BORSATO et al., 2000).

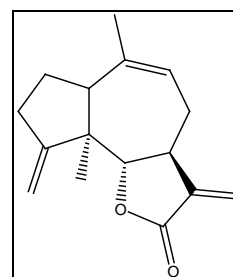


α -cubebina (R1 = α -OH; R2 = H) \rightarrow (43)
 β -cubebina (R1 = β -OH; R2 = H) \rightarrow (44)
 α -metil-cubebina (R1 = α -OCH₃; R2 = H) \rightarrow (45)
 β -metil-cubebina (R1 = β -OCH₃; R2 = H) \rightarrow (46)
 Pi = 3,4-metilenodioxifenil

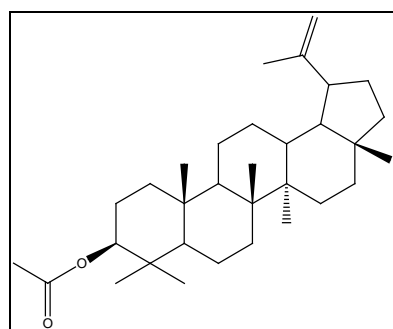
Cabral e colaboradores, 2000, conseguiram isolar do extrato acetato de etila do caule de *L. ericoides* esteróides como: estigmasterol (17), β -sitosterol (18) e campesterol (47) a LST eremantina (48) e triterpenos como acetato de lupeíla (49) e β -friedelanol (50).



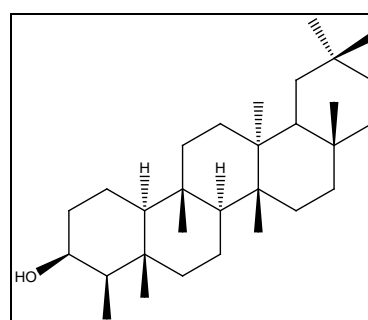
Campesterol (47)



Eremantina (48)



Acetato de lupeíla (49)

 β -friedelanol (50)

Flausino & Lopes, 2000, isolaram a LST centraterina (51) a partir do extrato de lavagem das folhas com diclorometano e Santos, 2000, isolou a LST goiazensolido (2) de cultura de calos. A literatura relata que estas duas LSTs apresentam atividade anti-

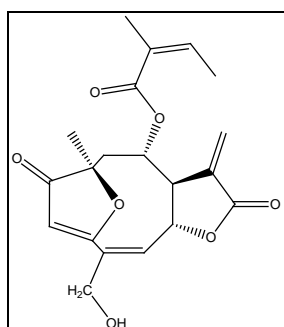
inflamatória *in vitro*, estando entre as mais potentes na inibição do fator transcricional central da inflamação, o fator nuclear κ B (NF- κ B) (RÜNGELER et al., 1999).

Uma vez que a medicina popular emprega a *L. ericoides* na forma de extratos alcoólicos e hidroalcoólicos (LOPES, 2001; SANTOS et al., 2005), a atenção dos estudiosos voltou-se para os extratos mais polares do vegetal.

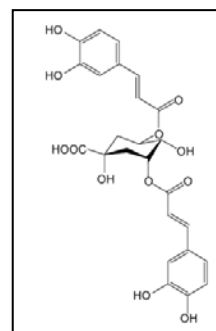
Os extratos aquosos das folhas e caule de *L. ericoides* apresentaram atividade antinociceptiva demonstrada no método da placa quente (CERQUEIRA et al., 1987).

Santos e colaboradores, 2005, demonstraram que a fração n-butanólica do extrato das raízes de *L. ericoides* e os ácidos 3,5- e 4,5-di-O-[E]-cafeoilquínicos (**52 e 53**) isolados dessa fração também apresentaram atividade antinociceptiva demonstrada no método de contorções.

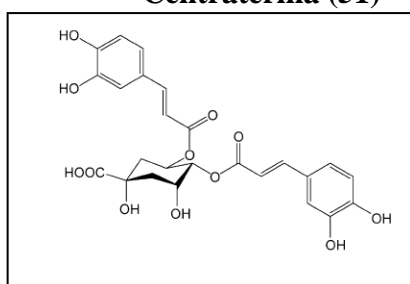
Santos, 2006, afirmou que as propriedades farmacológicas da *L. ericoides* são distribuídas em partes distintas da planta, sendo que as raízes possuem propriedades analgésicas e as folhas possuem atividades analgésicas e anti-inflamatórias. No mesmo trabalho, foi observado que o ácido clorogênico (**54**) extraído da arnica possui propriedade tanto analgésica como anti-inflamatória, mas não antipirética.



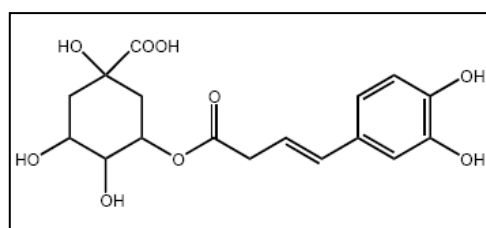
Centraterina (51)



3,5-di-O-[E]-cafeoilquínico (52)



4,5-di-O-[E]-cafeoilquínico (53)



Ácido clorogênico (54)

Segundo Gobbo-Neto e colaboradores, 2005, a fração aquosa do extrato polar das folhas de *L. ericoides*, a qual continha a flavona vicenina-2 (**31**) foi avaliada pelo método de edema de pata induzido pela carragenina em ratos e se mostrou ativa neste ensaio nas doses 15 e 90 mg/kg.

Em um recente estudo realizado por Guzzo e colaboradores, 2008, foram comparados os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de cinco espécies de *Lychnophora* e uma espécie de *Lychnophoriopsis*. Os extratos de *L. pinaster* (0,75 g/Kg) e *L. ericoides* (1,50 g/Kg) induziram um efeito antinociceptivo, o qual foi estatisticamente semelhante ao da dipirona e morfina (padrões) e diferente do grupo controle, pelo método da placa quente, em camundongos. *L. passerina*, *L. candelabrum* e *L. pinaster* demonstraram efeito antinociceptivo na dose de 0,75 g/Kg, o qual foi estatisticamente semelhante à indometacina (padrão), pelo método de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.

No teste de atividade anti-inflamatória usando o modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, a administração tópica dos extratos etanólicos de *L. pinaster* e *L. trichocarpha* mostraram uma atividade estatisticamente semelhantes ao padrão diclofenaco gel (GUZZO et al., 2008).

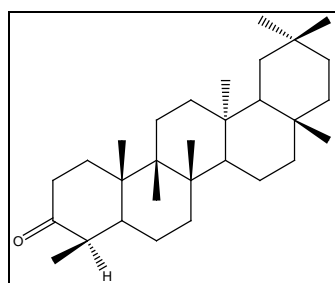
Ferrari, 2008, avaliou a atividade anti-inflamatória *in vivo* pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina, administrando topicamente extratos, frações e substâncias isoladas de *L. trichocarpha*. A administração dos extratos e frações a 10% e das substâncias isoladas a 1%, incorporados em pomada, comprovou a eficácia da via tópica dos mesmos quando comparado ao diclofenaco gel e ao fitoterápico Arnica montana gel (padrões).

Azevedo, 2004, demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *L. pinaster* administrado por via oral em camundongos apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente detectável na segunda fase do teste de formalina (fase inflamatória) e potencial antiedematogênico em baixas doses, evidenciado pela redução do edema de pata induzido pela carragenina. Atividade anti-inflamatória também foi observada na peritonite induzida pela carragenina. Por outro lado, o extrato aquoso da mesma espécie não demonstrou inibição significativa da enzima 5-lipooxigenase (LOX) (SILVEIRA et al., 2005), talvez devido à baixa lipofilicidade dos constituintes presentes nesse extrato (PANTHONG et al., 1994).

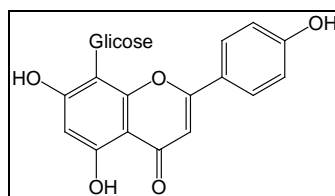
A arnica brasileira, *Lychnophora pinaster*, começou a ser usada no século XVIII pelos imigrantes italianos, em substituição à variedade européia (*Arnica montana* L.), aqui inexistente (LOPES, 2001). Talvez devido à semelhança dos efeitos clínicos entre a *L. pinaster* e a *Arnica montana*, estas sejam conhecidas vulgarmente por arnica.

A espécie de *Lychnophora pinaster* Mart. macerada em cachaça ou etanol é usada em infusões e banhos por apresentarem atividades antirreumática, analgésica e antiflogística. Um estudo fitoquímico dos extratos hexânico e etanólico das partes aéreas de *L. pinaster* levou ao

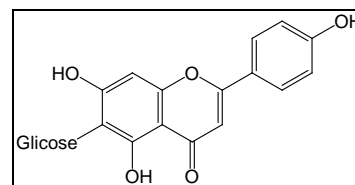
isolamento do ácido licnofóico (30), quercetina (6), lupeol (14), uma mistura de α e β -amirina (15 e 16), fridolina (55), uma mistura de ésteres de ácido graxo e a detecção do 15-desoxigoiazensolido (1), (OLIVEIRA et al., 1996; DUARTE, 1993; SILVEIRA et al., 2005) e hidrocarbonetos saturados (DUARTE, 1993). Duarte, 1999, isolou do extrato bruto aquoso de *L. pinaster* vitexina ou 8-C- β -glicosilapigenina (56) e isovitexina ou 6-C- β -glicosilapigenina (57), quercetina (26), ácido isoclorogênico (58) e ácido caféico (59); pela primeira vez foi relatada a presença de C-flavonóides neste gênero. Outro estudo das frações polares desta espécie identificou a presença de ácido cinâmico (60), ácido caféico (59), pinobanksina (38) e ácido clorogênico (54), sendo que algumas dessas substâncias foram encontradas pela primeira vez nesta espécie (FERREIRA et al., 2005).



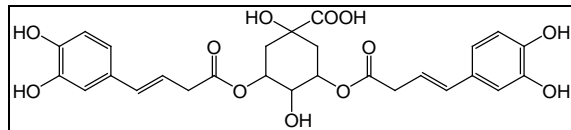
Fridolina (55)



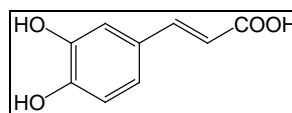
Vitexina (56)



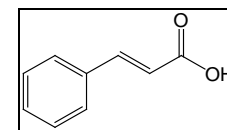
Isovitexina (57)



Ácido isoclorogênico (58)



Ácido caféico (59)



Ácido cinâmico(60)

Trabalhos realizados por Pinheiro, 2002, com a espécie *Lychnophora pinaster*, testando a influência de diferentes métodos de secagem sobre o rendimento de óleo essencial, permitiram obter como resultado um maior rendimento deste quando se empregaram folhas frescas na extração por refluxo etanólico. Não houve diferença significativa quando foram utilizadas flores frescas; validando cientificamente o uso empírico das folhas e flores como extrato alcoólico pela população.

1.2.2. Importância fitoterápica da arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.)

A arnica (*Lychnophora pinaster* Mart.), da família Asteraceae, é uma espécie medicinal, considerada endêmica do Brasil. A espécie possui folhas e flores aromáticas com propriedades medicinais, cuja ação farmacológica predominante ocorre no sistema

circulatório. A medicina popular a utiliza como anti-inflamatório, anestésico, cicatrizante, para traumatismos, contusões e picadas de insetos (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

A “arnica mineira”, assim definida por SEMIR, 1991, vem sendo explorada predatoriamente pela população, além de sofrer queimadas sistemáticas todos os anos, o que tem levado a uma preocupante diminuição de sua ocorrência. Atualmente, a *Lychnophora pinaster* encontra-se na Revisão das listas das espécies da flora e da fauna ameaçadas de extinção do estado de Minas Gerais (BIODIVERSITAS, 2007) que a colocou na categoria das espécies vulneráveis, cujas populações encontram-se em declínio em consequência da exploração excessiva, destruição dos habitats e alterações ambientais, e cuja sobrevivência definitiva ainda não tenha sido assegurada, o que poderá levar a espécie à extinção.

Portanto, estudos que busquem técnicas de cultivo para a arnica (*Lychnophora pinaster*), sua constituição química, atividades farmacológicas reais de seus extratos e constituintes puros e estudos sobre toxicidade permitirão obter mais informações científicas que servirão como base para o manejo racional da espécie, evitando assim o seu desaparecimento, além de fornecer subsídios para que a indústria farmacêutica introduza mais um agente terapêutico de qualidade no mercado de fitoterápicos.

1.2.3. Características da *Lychnophora pinaster* Mart.

Segundo Semir, 1991, a espécie *Lychnophora pinaster* (Figura 1.3A e 1.3B) ocorre em ambientes extremamente xéricos, sendo encontrada em campos de canga (Serra de Rola Moça, Moeda e Curral) crescendo entre blocos de rochas ou altos de pequenos morros expostos à intensa insolação. Segundo Silva, 1994, a floração ocorre entre os meses de agosto a outubro; durante a transição da estação seca para a chuvosa. As primeiras chuvas e o início do aumento de temperatura parecem ser o estímulo para a floração. A fenofase (floração) coincide com a época em que as plantas apresentam maior percentual de folhas adultas. O tempo médio de floração da arnica mineira é de aproximadamente oito semanas. A dispersão de frutos dá-se entre os meses de dezembro e fevereiro, sendo esta época a mais indicada para a coleta de aquênios. Parece provável que a alternância de temperatura seja imprescindível para obtenção de maior percentual de germinação dos aquênios da arnica-mineira. A planta mantém folhas verdes o ano todo.

De acordo com Semir, 1991, *L. ericoides* é uma espécie muito semelhante à *L. pinaster* Mart. Às vezes, a separação entre elas é difícil e problemática. Ambas, e

principalmente a *L. pinaster*, são bastante polimórficas no porte, diâmetro dos ramos, forma, comprimento e largura das folhas. Dessa forma, segundo o autor, variantes destas espécies podem sobrepor caracteres e serem confundidas entre si.

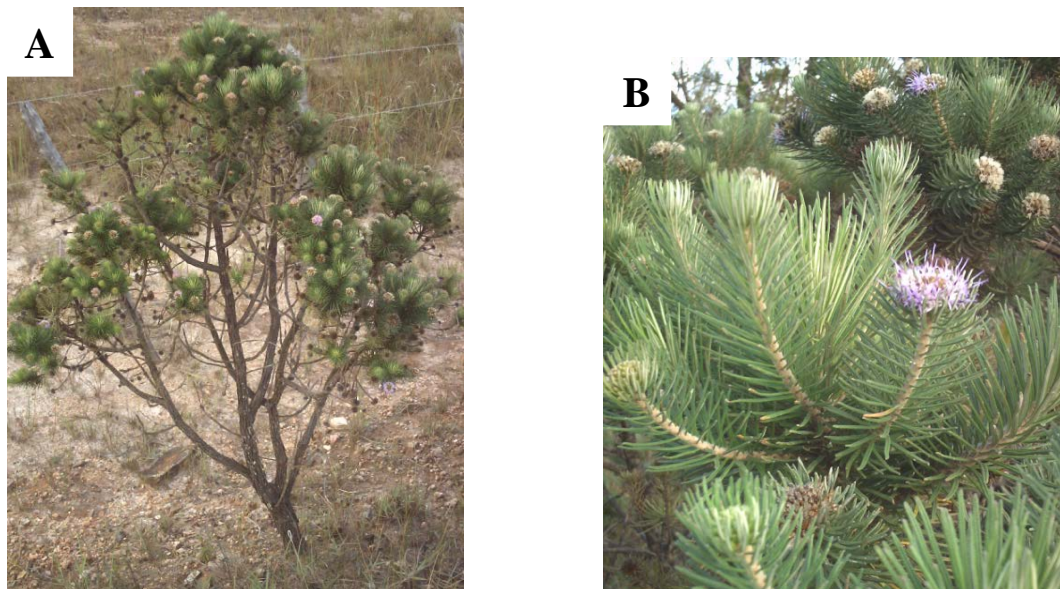


Figura 1.3 - *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae). **A** - indivíduo adulto no habitat natural; **B** - flores.

1.2.4. Descrição botânica da espécie vegetal

Lychnophora pinaster Mart. (syn. *Vernonia pinaster* Mart. Less.) é uma planta que varia de subarbusto ereto com muitos ramos a pequenos arbustos ericóides e, mais raramente, a arbustos mais altos, candelabriformes, com 0,4 a 2,4 m e raramente, com até 3,6 m. Ramos alternos a subverticiliados flexuosos e delicados até mais robustos, densamente tomentosos a velutinos ou curtamente subvilosos, geralmente de coloração cinérea a negriscente abaixo e mais ou menos canescente acima, às vezes variadamente ocrácea até atrofusca com cicatrizes triangulares a circulares, ou formando alvéolos subrômnicos, dando aos ramos o aspecto tesselado com 0,5 a 2,0 cm de diâmetro, com o eixo principal basal (tronco) atingindo 2,5 a 5,0 cm de diâmetro nas regiões mais velhas das plantas arbustivas maiores. Folhas muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais patentes até pouco reflexas abaixo, geralmente lineares, linear-oblongas, rosmarinióides e ericóides, às vezes longamente lineares em forma de fita, base arredondada a auriculada às vezes ligeiramente atenuada, ápice obtuso a pouco arredondado, raramente pouco agudo, margem revoluta; venação broquidódroma; face adaxial densamente tomentosa canescente com nervura principal subvilosa quando jovem, subglabrescente, permanecendo pouco pubérula até totalmente

glabra quando velha, geralmente muito rugosa e bulada, às vezes quase lisa, nervura principal alargada, afinando da base para o ápice, com indumento subviloso às vezes permanente, nervuras de outras ordens variadamente evidentes e impressas; face abaxial inferior totalmente tomentosa com tricomas subvilosos entremeados aos tomentosos, cobrindo todas as nervuras, com a principal subquadrática, não alada, sulcada longitudinalmente e bem evidente e saliente com geralmente 0,5 a 6,0 cm de comprimento, mais raramente podendo atingir até 12,0 cm de comprimento e cerca de 0,1cm de largura. Inflorescência em glomérulos simples folhosos, geralmente muito congestos, hemisféricos com folhas esparsas entre eles com 1,0 a 1,5 cm de comprimento e 2,0 a 3,0 cm de diâmetro, em ramos folhosos com até 10,0 cm de comprimento e até 0,3 cm raramente 1,0 cm de diâmetro. Capítulos (Figura 1.4A e 1.5A) campanulados a cilíndricos com 3 a 5 flores, com 6,5 a 8,0 mm de comprimento e 3,0 a 5,0 mm de diâmetro. Brácteas involucrais em 4 a 5 séries com as exteriores triangulares a subovais, as interiores mais lanceoladas a oval lanceoladas, côncavas de ápice largamente obtuso a arredondado com mancha marrom, margem inteira membranácea, escariosa de coloração mais pálida, superfície tomentosa quando jovem, glabrescente com 2,0 a 8,0 mm de comprimento e 1,0 a 2,0 mm de largura. Flores lilazes a púrpuras com 8,0 a 10,0 mm de comprimento, lacíneos glabros, glandulosos com até 4,0 mm de comprimento. Anteras alvas com até 4,0 mm de comprimento. Aquênio (Figura 1.4B e 1.5B) obcônico a oval cilíndrico, glabro, glandulosos oliváceo a castanho, às vezes com manchas atropurpúreas, costado, às vezes com costas pouco evidentes, anguloso, com 1,5 a 3,0 mm de comprimento e 0,8 a 1,5 mm de diâmetro, pappus externo quadrático, pouco coroniforme com ápice truncado a ligeiramente eroso a crenulado com 0,5 a 2,0 mm de comprimento, série interna às vezes pouco espiralada com 10 a 15 páleas com 5,5 a 6,0 mm de comprimento (SEMIR, 1991).

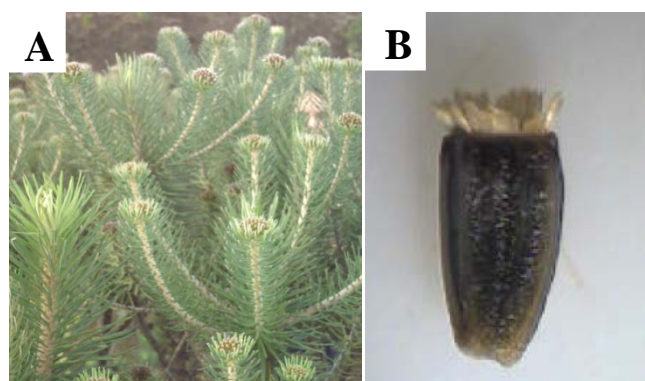


Figura 1.4 A) Capítulos com aquênios sem o papus interno, já em dispersão.
B) Aquênio sem papus interno aderido. Fonte: UFLA, Lavras, MG, 2009.

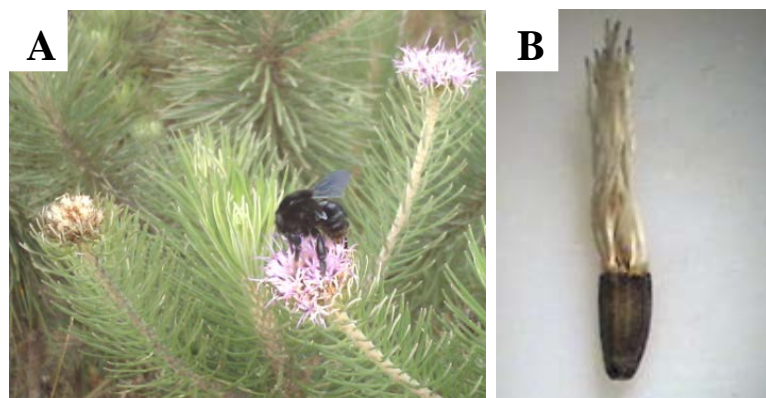


Figura 1.5 A) Capitulos com aquênios com papus interno presente.

B) Aquênio com papus interno aderido. Fonte: UFLA, Lavras, MG, 2009.

1.2.5. Inflamação

As plantas medicinais vêm sendo usadas, por um longo tempo, no tratamento de várias doenças (GRABLEY & THIERICKE, 1999). Ainda hoje, as plantas continuam sendo um importante recurso na busca de princípios ativos. Muitas delas têm sido investigadas a fim de descobrir novos medicamentos ou protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e dentre essas, muitas são conhecidas por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas (BOHLIN, 1995).

Atualmente, os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os não-esteroidais (AINEs) são utilizados com a finalidade de conter e reverter o processo inflamatório seja ele local ou sistêmico (MENDES, 2001). O mercado mundial de medicamentos, em 2001, faturou cerca de 10,9 bilhões de dólares com a venda de AINEs (WHO, 2004). O uso prolongado de AINEs está associado com o aparecimento de efeitos colaterais severos, tais como a hemorragia gastrintestinal (ROBERT et al., 1979; MILLER, 1983), reações cutâneas, efeitos adversos renais, distúrbios na medula óssea e alterações hepáticas (VARGA, 2007). Conseqüentemente, há uma necessidade de desenvolver novos agentes anti-inflamatórios com mínimos efeitos colaterais (VANE & BOTTING, 1987).

A inflamação é uma resposta à infecção, antígenos ou lesão tecidual e tem por função erradicar os agentes microbianos ou irritantes e potencializar o reparo tecidual (FLOWER & PERRETTI, 2005; NATHAN, 2002; SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004; TRACEY, 2002).

De modo didático, a resposta inflamatória pode ser dividida em três fases distintas, cada uma delas sendo mediada aparentemente por mecanismos diferentes. Assim, é

inicialmente evidenciada uma fase aguda, de duração variável, com alterações vasculares (fluxo/calibre vascular, além de um aumento da permeabilidade vascular), seguida de uma fase subaguda caracterizada por infiltração de leucócitos e de outras células fagocíticas (quimiotaxia/adesão/transmigração e fagocitose) e posteriormente, uma fase crônica em que ocorrem degeneração tecidual e fibrose (SUZUKI et al., 2003; ROBERTS & MORROW, 2005).

Inicialmente no foco inflamatório predominam fenômenos vasculares: vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar (CIRINO et al., 2003), gerados principalmente pelos seguintes mediadores: aminas vasoativas (histamina e serotonina); produtos de clivagem dos sistemas enzimáticos presentes no plasma (sistemas complemento, coagulação e cininas); por mediadores lipídicos gerados da metabolização do ácido araquidônico (AA), para formar prostaglandinas (PGs) tais como PGI₂, PGE₁, PGE₂, PGD₂; leucotrienos (LTs) como LTC₄, LTD₄, LTE₄; tromboxanos (TXs) como TXA₂ e fator de ativação plaquetário (PAF); óxido nítrico (NO - potente vasodilatador endógeno) e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (neuropeptídeos como as taquicininas, substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina - CGRP) (HEDQVIST et al., 2000; LECCI et al., 2000). Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão (edema) (PATTERSON & LUM, 2001; LEY, 2002).

Após esta fase inicial, evidencia-se uma fase subaguda que é caracterizada por migração e infiltração de leucócitos e de células fagocíticas, no sítio da lesão. Este evento celular é denominado quimiotaxia (ALI et al., 1997; FRANGOIANNIS et al., 2002). No local da lesão, os neutrófilos e os macrófagos reconhecem o agente agressor, englobam (fagocitose) e o destroem (RODRIGUES et al., 2002), além de liberarem enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente agressor (BENJAMINI et al., 2002). Ainda, no foco inflamatório há a ativação dos mastócitos e agregação plaquetária, que também resultam na liberação de mais mediadores quimiotáticos. Dentre os mediadores quimiotáticos citam-se: os derivados da via da lipoxigenase (5-HETE, LTB₄), componentes do sistema complemento, sobretudo C5a, citocinas como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8) e a interleucina-16 (IL-16) que são liberadas por neutrófilos ativados, macrófagos e outros (ŠTVRTINOVÁ et al., 1995; FEGHALI & WRIGHT, 1997; TAN et al., 1999; FERREIRA, 2002).

A necessidade de interferência clínica e/ou farmacológica no processo inflamatório justifica-se principalmente quando a inflamação deixa de ter papel protetor passando a atuar contra os tecidos do próprio corpo, de modo que as próprias respostas podem produzir lesão e passar a constituir parte do processo patológico, como na anafilaxia e na artrite reumatóide (NASCIMENTO, 2007), ou quando suas manifestações são exacerbadas a ponto de se tornarem incômodas ao indivíduo, o que caracteriza a dor inflamatória (FERREIRA, 2002a)

1.2.6. Dor e nocicepção

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma experiência desagradável, de natureza sensorial, cognitiva e emocional associada com dano tecidual real ou potencial (DICKENSON & BESSON, 1997). É importante salientar que, quando um tecido for lesado, o organismo reage desencadeando um estímulo doloroso como mecanismo de proteção (MILLAN, 1999; 2002).

Nocicepção é um termo aplicado aos mecanismos neurológicos que detectam um estímulo lesivo (FERREIRA, 2002a). Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES, 1992).

A percepção do estímulo nociceptivo na periferia se dá por estruturas específicas localizadas na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais, denominadas nociceptores (ou receptores da dor), os quais são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele; é ela que fornece a maioria das informações nociceptivas (dolorosas, que são resultantes de lesões ou que poderiam causar lesões) periféricas ao sistema nervoso central (SNC) (JULIUS & BASBAUM, 2001).

A sensibilização dos nociceptores se deve a diferentes estímulos, tais como, mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), hipóxia ou lesão tecidual seguida de inflamação (estímulo nocivo químico). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, os quais normalmente não são responsivos a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se

sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS & BASBAUM, 2001). A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes primárias (FAPs - neurônios de primeira ordem) ao SNC. Essas fibras são classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução, essencialmente em três tipos:

- ✓ fibras C: finas (0,4 a 1,2 μm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s);
- ✓ fibras A δ : médias (2 a 6 μm de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s)
- ✓ fibras A β : espessas (mais de 10 μm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s). Este grupo de fibras participa muito pouco de processos nociceptivos agudos, estando mais envolvidos em casos de alodínia e em dores crônicas (MILLAN, 1999).

A sensibilização dos nociceptores ocasiona a liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam ou facilitam a transmissão da informação ao SNC. Esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann. Quando é considerado um quadro crônico, também participam da transmissão nociceptiva mediadores liberados a partir de células inflamatórias (BESSON & CHAOUCH, 1987).

Diversos mediadores têm sido propostos na gênese e na transmissão da dor, destacando-se entre eles, os metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), peptídeos (bradicinina, taquicininas, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, substância P (SP), colecistocinina, peptídeo intestinal vasoativo, serotonina, citocinas, óxido nítrico (NO), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), prótons, entre outros. Além desses, outros mediadores químicos, tais como os aminoácidos excitatórios (glutamato, aspartato), acetilcolina, e outros, que podem ser produzidos ou liberados após lesão tecidual ou ainda por irritantes exógenos (formalina, capsaicina, ácido acético), são também responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão da dor, tanto no sistema nervoso periférico quanto central. Alguns mediadores atuam através da interação com receptores acoplados a proteínas G, desencadeando a formação de segundos mensageiros, como o adenosina monofosfato-cíclico (AMPC), guanosina monofosfato-cíclico

(GMPc), várias classes de proteínas quinase, inositol trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), aumento de cálcio intracelular e ativação de canais iônicos. Estes eventos iniciais induzem a ativação secundária de quinases intracelulares tais como a proteína quinase A (PKA) e C (PKC). Outros mediadores da nocicepção ativam diretamente canais iônicos, os quais são capazes de alterar a permeabilidade da membrana a íons (PLEUVRY & LAURETTI, 1996; MILLAN, 1999; CALIXTO et al., 2000; PETERSEN-ZEITZ & BASBAUM, 1999; WOOLF & SALTER, 2000; JULIUS & BASBAUM, 2001; PARADA et al., 2003).

1.2.7. Toxicidade

Os estudos toxicológicos apresentam como principal objetivo a predição dos possíveis efeitos adversos, que podem se manifestar quando da exposição humana à determinada substância química, seja ela um medicamento, um praguicida, um agente químico industrial ou outros (KOETER, 1993; STOKES, 2002; MEYER, 2003). Por esta razão, tais estudos são sempre requeridos nos processos investigativos, desde o desenvolvimento de produtos até seu registro e comercialização, sendo os modelos animais os mais utilizados para este propósito (STOKES, 2002; MEYER, 2003).

No Brasil, as plantas medicinais são usadas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas. Muitas vezes, essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos nativos dos locais de origem das plantas (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Este hábito é arriscado, pois, apesar de muitas plantas serem úteis ao homem, algumas possuem substâncias que exercem efeitos adversos. Ocasionalmente, uma mesma planta pode apresentar tanto ação terapêutica quanto ação tóxica. A distinção entre substâncias medicamentosas e tóxicas existe somente em relação à dose, finalidade e modo de preparo (GOMES et al., 2001; MORGAN, 2003; ARNOUS et al., 2005).

A partir do momento em que a legislação definiu fitoterápicos como medicamentos, estes ficaram sujeitos às leis vigentes. Assim, além de provas de eficácia, os fitoterápicos e as plantas medicinais deverão possuir estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer aos pesquisadores alguma segurança sobre as doses nas quais aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (BRITO, 1996).

Atualmente as regras, que norteiam os registros e alguns ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, de medicamentos fitoterápicos, estão descritos na Resolução nº 90, de 16/03/2004 (BRASIL, 2004).

Como opção para a investigação da presença de possíveis agentes tóxicos nos extratos vegetais, o método da toxicidade aguda em dose simples representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico (BRITO, 1994).

1.2.7.1. Toxicidade aguda

Toxicidade aguda é definida como o conjunto de efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto, após a administração de uma dose única, ou doses múltiplas administradas dentro de um período de 24 horas, tendo como objetivo determinar a sintomatologia em curto prazo após a administração de um composto (BARROS & DAVINO, 2003).

Para os estudos de toxicidade aguda deve-se utilizar a via de administração preconizada para o homem (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE, 1988). A Resolução nº 90 de 16 de março de 2004 estipula que para os testes de toxicidade aguda de um novo medicamento seja utilizada uma espécie de mamífero, geralmente as mais utilizadas são os camundongos e ratos, machos e fêmeas no mínimo seis de cada, de linhagens exogâmicas bem definidas e de características fisiológicas conhecidas (LAPA et al., 2007). Estes animais devem ser tratados com três ou mais doses do produto a ser testado para observação de possíveis efeitos adversos e comparados com o grupo controle. Se os efeitos adversos não forem observados nessas doses deve-se utilizar a dose máxima possível (BRASIL, 2004). A manutenção dos animais tratados agudamente por sete ou quatorze dias, permitirá verificar os efeitos tardios do tratamento e se a recuperação da ação tóxica ocorre durante esse período de observação dos animais sobreviventes. A avaliação dos resultados imediatamente após o período de 24 horas permitirá conhecer a espécie mais sensível e o índice de letalidade; a forma de morte produzida pelo excesso do produto em teste e os órgãos alvo; as alterações comportamentais; alterações hematológicas, da bioquímica plasmática e urinária e alterações de pêlo, pele e mucosas; sistemas respiratório e circulatório; sistemas nervoso central e periférico e atividade somatomotriz. Especial atenção é dada aos sintomas, tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma (LAPA et al., 2007; BRITO, 1994).

O teste de toxicidade aguda é obrigatório para todos os tipos de materiais em teste, independente do tempo de uso proposto para a espécie humana, pois evidencia o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não e a forma de preveni-las. Além disso, os resultados obtidos dão suporte à escolha das doses para os demais testes de toxicidade (LAPA et al., 2007).

Considerando as atividades farmacológicas das espécies do gênero *Lychnophora* aqui mencionadas, a ocorrência da “arnica” em Minas Gerais e seu imenso uso popular no Estado, torna-se relevante o estudo mais aprofundado destas espécies vegetais no sentido de se obter dados pré-clínicos do ponto de vista toxicológico, farmacológico e terapêutico. Estes estudos contribuirão para o uso popular mais seguro da “arnica”, para a descoberta de suas substâncias com atividade analgésica e anti-inflamatória, além de poderem contribuir para o desenvolvimento de um novo fitoterápico para dor e inflamação.

1.3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Em nossos laboratórios foram realizadas triagens para verificação da atividade inibitória da enzima xantina oxidase e da atividade analgésica e anti-inflamatória de cinco espécies do gênero *Lychnophora* e uma espécie de *Lychnophoriopsis* (*L. passerina*, *L. staavioides*, *L. trichocarpha*, *L. pinaster*, *L. ericoides* e *Lychnophoriopsis candelabrum*) (Ferraz-Filha e colaboradores, 2006 e Guzzo e colaboradores, 2008, respectivamente). Ferraz-Filha, 2008 avaliou a toxicidade *in vitro* destas seis espécies através do teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina*. Dentre estas espécies, *L. pinaster* apresentou uma atividade moderada para a inibição da xantina oxidase; já para as atividades analgésica e anti-inflamatória apresentou resultados significativos nos métodos da placa quente e edema de pata quando comparada aos padrões utilizados. No teste de citotoxicidade o extrato bruto de *L. pinaster* foi considerado citotóxico. Por esses motivos, a espécie *L. pinaster* foi escolhida para o estudo de toxicidade aguda e avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória garantindo o uso mais seguro desta espécie vegetal pela população.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Considerando as atividades farmacológicas das espécies do gênero *Lychnophora*, a ocorrência da “arnica” em Minas Gerais e seu amplo uso popular, a proposta deste trabalho consistiu na realização da avaliação da toxicidade em camundongos e das atividades anti-inflamatória e analgésica do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* Mart. objetivando o uso mais seguro desta espécie vegetal pela população.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Realizar o fracionamento cromatográfico do extrato etanólico de *L. pinaster* Mart. para obter e determinar as frações ativas.

2.2.2. Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico de *L. pinaster* e de suas frações administrados por via tópica, utilizando o modelo de edema de pata induzido pela carragenina.

2.2.3. Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato etanólico de *L. pinaster* administrado por via oral, utilizando o método da placa quente.

2.2.4. Avaliar a toxicidade em camundongos do extrato etanólico de *L. pinaster* administrado por via oral a fim de garantir o uso seguro da espécie pela população.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Equipamentos

Aparelho de bioquímica Random Access Clinical Analyser, Wiener lab, modelo CM-200.

Aparelho de hemograma ABX diagnostics, micros 60.

Balança analítica Eletronic Balance Bioprecisa, modelo FA2104U.

Balança analítica Stimadzu, modelo AUW220D.

Balança semi-analítica Quimis, modelo BG 400.

Balança para animais Beyond Technology, Filizole MF.

Banho de ultrassom Ultra Sonic Cleaner.

Banho Maria Fanem, modelo 100.

Bomba de vácuo BÜCHI, modelo vacuum pump V-700.

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, alliance) equipado com bomba e auto-injetor (Waters, 2695) e detector espectrofotométrico por arranjo em fotodiodo no espectro ultravioleta visível (Waters, 2996).

Estufa Quimis, modelo Q317B142.

Estufa Biociclo.

Estufa ventilada Fabbe, modelo 171.

Evaporador rotatório BÜCHI, modelo R-205.

Freezer Consul 300.

Geladeira Dako DR 280.

Microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000 B e analisador e processador de imagem Leica Qwin

Microcentrífuga Eppendorf Centrifuge, modelo 5415D.

Micropipetas automáticas monocanal ajustável de 200 µL e 200-1000 µL, Gilson.

Moinho de facas MR (Manesco e Ranieri), modelo MR 340.

Microscópio Olympus CX21.

Microscópio Olympus BX50.

Paquímetro metálico 150 mm-6", Vonder.

Sistema de filtração de água Milli-Q, modelo Millipore Simplicity, 185.

3.1.2. Reagentes e materiais de consumo

Acetato de etila PA ACS, Vetec.

Acetona PA, Vetec.

Anisaldeído (4-aldeído anísico PS), Vetec.

Ácido acético glacial PA, Vetec.

Ácido 3,5-dinitrobenzóico, Aldrich.

Ácido clorídrico PA ACS, Quimex.

Ácido fórmico 85% PA, Vetec.

Ácido sulfúrico 95-97% PA, Cromoline.

Álcool etílico 96 GL, Topázio.

Álcool etílico 96% PA, Cromoline.

Álcool estearílico Chemax.

Anidrido acético PA, Vetec.

Carbonato de bismuto básico PA, Reagen.

Carragenina, Sigma.

Cloreto de alumínio PA, Riedel.

Cloreto de sódio PA, Vetec.

Cloreto férrico PA, Ecibra.

Cloridrato de morfina, Sigma-Aldrich.

Clorofórmio PA, Vetec.

Coco caprilato caprato, Croda do Brasil.

Coloração panótica rápida, Instant Prov, Newprov.

Coluna: Waters Spherisorb® C18 150 mm x 4,6 mm x 5 µm.

Diclofenaco dietilamônio (11,6 mg/g, Cataflan Emulgel[®]), Novartis.

Diclofenaco dietilamônio, Farmácia de manipulação AVIAR (Mariana-OP).

Diclorometano PA ACS, Vetec.

Difenilboriloxietilamina (NP), Sigma.

Dipirona sódica, Eurofarma.

DMSO USP, Labsynth.

EDTA, Laborlab.

Éter etílico puríssimo 96%, Isofar.

Ferrocianeto de potássio PA, Reagen

Formol (Formaldeído puro 36%), Vetec.
Glicerina PA, Vetec.
Hidróxido de potássio PA ACS, Reagen.
Hidróxido de sódio PA, Reagen.
Indometacina, Sigma-Aldrich.
Iodeto de sódio PA, Isofar.
Metanol grau HPLC, J. T. Baker.
Metanol PA ACS, Vetec.
Microfiltro Millipore, unidade filtrante com poro 0,22 µm, Millex[®].
Natrozol 250, Natural Pharma.
n-Hexano PA, Vetec.
n-Butanol PA, Isofar.
Nipagin/Nipazol, Natural Pharma.
Óleo mineral (vaselina líquida), Isofar.
Pentobarbital (Hypnol), Cristália.
Polawax, Farnos.
Polietilenoglicol 4000 USP, Labsynth.
Pré-coluna: Waters Symmetry[®] C18 22 mm x 4,6 mm x 5 µm.
Propilenoglicol PA, Isofar.
Sephadex[®] LH-20, Sigma.
Sílica Gel 60G para cromatografia em camada fina, Merck.
Sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) (70-230 mesh) para cromatografia em coluna, Merck.
Sulfato cérico PA, Vetec.
Sulfato de sódio anidro PA, Vetec.
Tolueno 99,5% PA ACS, Isofar.
Trietanolamina PA, Vetec.
Tubo de plástico tipo safe-lock graduado, Eppendorf.
Tween 80 USP, Labsynth.

3.1.3. Kits para análise bioquímica

Ácido úrico líquido estável: teste enzimático (Bioclin), Lote: 0050; Referência: K052; ANVISA: 10269360066.

Amilase cinética (Bioclin), Lote: 024; Referência: K046; ANVISA: 10269360079.

Creatinina cinética (Bioclin), Lote: 043; Referência: K067; ANVISA: 10269360089.

Fosfatase alcalina cinética (Bioclin), Lote: 022; Referência: K021; ANVISA: 10269360072.

Proteínas totais: teste colorimétrico (Bioclin), Lote: 0110; Referência: K031; ANVISA: 10269360116

Transaminase ALT (TGP) cinética (Bioclin), Lote: 046; Referência: K049; ANVISA: 10269360145.

Transaminase AST (TGO) cinética (Bioclin), Lote: 051; Referência: K048; ANVISA: 10269360119.

Uréia cinética líquido estável: teste enzimático (Bioclin), Lote: 033; Referência: K056; ANVISA: 10269360068.

3.1.4. Reveladores para cromatografia em camada delgada

3.1.4.1. Anisaldeído sulfúrico (WAGNER et al., 1984)

Foram misturados, nessa ordem e sob resfriamento, 0,5 mL de anisaldeído com 10,0 mL de ácido acético glacial, seguido de 85,0 mL de metanol e 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v). O reagente tem estabilidade limitada e foi armazenado em geladeira a 4° C.

3.1.4.2. Reagente de Dragendorff (WAGNER et al., 1984)

Uma mistura de 2,6 g de carbonato de bismuto, 7,0 g de iodeto de sódio e 25,0 mL de ácido acético glacial foi aquecida até a fervura por alguns minutos. O sistema foi deixado em repouso por uma noite e, após precipitação, filtrado para remoção do acetato de sódio. Para o preparo da solução estoque 20,0 mL do filtrado anterior, de coloração avermelhada, foram misturados a 80,0 mL de acetato de etila. O revelador para uso em cromatografia em camada delgada (CCD) foi obtido pela mistura de 2,0 mL da solução estoque com 5,0 mL de ácido acético glacial e 12,0 mL de acetato de etila. A solução foi armazenada em geladeira a 4° C.

3.1.4.3. Reagente para produtos naturais (NP/PEG) (WAGNER et al., 1984)

Para o preparo da solução de produtos naturais a 2%, dissolveu-se 0,2 g de difenilboriloxietilamina (NP) em 10,0 mL de metanol. Essa solução foi armazenada a 4° C até o momento de uso. A solução de polietilenoglicol 5% foi preparada pela dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) em 10,0 mL de etanol e armazenada à temperatura ambiente. A placa cromatográfica foi borrifada com solução metanólica a 2% de difenilboriloxietilamina, seguido de solução etanólica a 5% de polietilenoglicol 4000.

3.1.4.4. Hidróxido de potássio 5% em metanol (WAGNER et al., 1984)

A solução foi preparada dissolvendo-se 0,5 g de hidróxido de potássio em 10,0 mL de metanol e armazenada a 4° C.

3.1.4.5. Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER et al., 1984)

Foram adicionados a 50,0 mL de etanol absoluto, cuidadosamente e sob resfriamento, 5,0 mL de anidrido acético e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v). O reagente por ser bastante instável foi preparado no momento do uso.

3.1.4.6. Cloreto férrico 2% (WAGNER et al., 1984)

A solução de cloreto férrico foi preparada dissolvendo-se 0,2 g de cloreto férrico em 10,0 mL de água. O material foi armazenado a 4° C.

3.1.4.7. Ferrocianeto de potássio 1% (WAGNER et al., 1984)

A solução de ferrocianeto de potássio foi preparada dissolvendo-se 0,1 g de ferrocianeto de potássio em 10,0 mL de água e armazenada a 4° C.

3.1.4.8. Reagente de Kedde (WAGNER et al., 1984)

Foram misturados 5,0 mL de uma solução etanólica a 3% de ácido-3,5-dinitrobenzóico recém preparada a 5,0 mL de uma solução de NaOH 2,0 mol/L. O material por ser instável foi preparado no momento do uso.

3.1.4.9. Ácido sulfúrico a 50% em metanol (WAGNER et al., 1984)

A solução de ácido sulfúrico a 50% (v/v) foi preparada pela adição de 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% p/v) a 5,0 mL de metanol, em banho de gelo, e em seguida armazenada a 4° C.

3.2. MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas da espécie *L. pinaster* Mart. foram coletadas em março de 2007, nos campos rupestres do município de Nova Lima (MG), com autorização do IBAMA. O material botânico foi identificado pelo Dr. Júlio Antônio Lombardi. As exsiccatas foram depositadas no Herbarium do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (BHCB/UFMG) e catalogadas com o número de registro 19.520.

As partes aéreas frescas foram deixadas em estufa ventilada, a 40° C, por cinco dias, até a completa secagem. Posteriormente, o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado.

3.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

O material vegetal seco e triturado (2.139,0 g) foi percolado com etanol (PA) até o seu esgotamento. O solvente extrator foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo à temperatura não superior a 40° C para a obtenção do extrato etanólico bruto (Figura 4.1, pág. 57). Este extrato foi mantido sob vácuo até completa eliminação do solvente e denominado LPiE.

3.4. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

3.4.1. Preparo da amostra

A presença de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico bruto (LPiE) foi avaliada qualitativamente por CCD. Uma amostra de LPiE foi dissolvida em etanol e aplicada na CCD de sílica gel 60G. As análises foram realizadas de acordo com metodologias descritas por Farnsworth, 1966, Marini-Bettolo e colaboradores, 1981 e Wagner e colaboradores, 1984 (Tabela 4.1, pág. 59).

3.4.1.1. Caracterização de taninos e polifenóis

A CCD contendo a amostra foi eluída empregando-se como fase móvel uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27) e analisada sob luz visível, após ser aspergida com mistura 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% e cloreto férrico 2% e aquecida a 100° C em estufa por 5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração castanho-avermelhada, violeta, verde, negro-azulada ou azul (visível) foi o parâmetro observado para caracterizar a presença de taninos e polifenóis.

3.4.1.2. Caracterização de heterosídeos flavônicos

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (80:9:9:22). Após ser aspergida com reagente NP/PEG e aquecida a 100° C por 5 minutos, a placa foi analisada sob luz visível e UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada ou alaranjada (UV₃₆₅ nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de heterosídeos flavônicos.

3.4.1.3. Caracterização de agliconas flavônicas

A CCD contendo uma amostra do extrato etanólico foi eluída com tolueno: acetona: clorofórmio: ácido acético (40:25:35:25). Após ser aspergida com reagente NP/PEG e aquecida a 100° C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível e luz UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas de coloração amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada ou alaranjada (UV₃₆₅ nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de agliconas flavônicas.

3.4.1.4. Caracterização de heterosídeos antraquinônicos

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (80:9:9:22). A placa cromatográfica foi aspergida com ácido nítrico concentrado, aquecida a 120° C por 10 minutos e em seguida aspergida com solução de hidróxido de potássio a 5% em metanol, aquecida a 100° C por 5 minutos e analisada sob luz visível e luz UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas de coloração alaranjada a vermelha (visível) e fluorescência alaranjada a vermelha (UV₃₆₅ nm) foram parâmetros utilizados para caracterizar a presença de

antraquinonas, e de manchas de cor amarela (visível) e fluorescência alaranjada a vermelha (UV₃₆₅ nm) para caracterizar a presença de antronas e antranóis.

3.4.1.5. Caracterização de agliconas antraquinônicas

A CCD contendo uma amostra do extrato etanólico foi eluída com tolueno: acetona: clorofórmio (25:10:10). A placa cromatográfica foi aspergida com solução de hidróxido de potássio a 5% em metanol, aquecida a 100° C por 5 minutos e analisada sob luz visível e luz UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas de coloração alaranjada a vermelha (visível) e fluorescência alaranjada a vermelha (UV₃₆₅ nm) foram parâmetros utilizados para caracterizar a presença de antraquinonas, e de manchas de cor amarela (visível) e fluorescência alaranjada a vermelha (UV₃₆₅ nm) para caracterizar a presença de antronas e antranóis.

3.4.1.6. Caracterização de triterpenos e esteróides

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de hexano: acetato de etila (80:20). Após ser aspergida com reagente de Liebermann-Burchard e aquecida a 100° C, por 10 minutos, a placa foi observada sob luz visível e luz UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas roxas ou róseas (visível) e fluorescência amarelada (UV₃₆₅ nm) foi o parâmetro utilizado para verificar a presença de triterpenos. O aparecimento de manchas azul-esverdeadas ou róseo-azuladas (visível) e fluorescência amarelada (UV₃₆₅ nm) foi o parâmetro utilizado para verificar a presença de esteróides.

3.4.1.7. Caracterização de cumarinas

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de tolueno: éter etílico: ácido acético (30:30:30). Após aspensão com solução metanólica de hidróxido de potássio a 5% e aquecimento a 100° C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz UV₃₆₅ nm. O aparecimento de manchas com fluorescência verde-azulada ou azul (UV₃₆₅ nm) foi o parâmetro utilizado para caracterizar a presença de cumarinas.

3.4.1.8. Caracterização de saponinas

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de clorofórmio: metanol: água (64:50:10). Após ser aspergida com anisaldeído sulfúrico e aquecida a 100° C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível. O

aparecimento de manchas de coloração azul ou azul-violeta e zonas amareladas (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de saponinas.

3.4.1.9. Caracterização de heterosídeos cardiotônicos

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de acetato de etila: metanol: água (84:11:8). Após ser aspergida com reagente de Kedde, a placa foi analisada sob luz visível. A presença de manchas de coloração rósea ou azul-violácea (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de heterosídeos cardiotônicos do tipo cardenolídeos.

3.4.1.10. Caracterização de alcalóides

A CCD contendo uma amostra do extrato etanólico foi eluída com acetato de etila: metanol: água (40:10:20). Após ser aspergida com reagente de Dragendorff, a placa foi observada sob luz visível. O aparecimento de manchas de coloração marrom ou alaranjada (visível) foi o parâmetro utilizado como indicativo da presença de alcalóides.

3.4.1.11. Caracterização de protoantocianidinas

Uma amostra do extrato etanólico foi aplicada na CCD que foi eluída com uma mistura de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). Após ser aspergida com solução metanólica de ácido sulfúrico a 50% e aquecimento a 100° C por 5 minutos, a placa foi observada sob luz visível. A presença de protoantocianidinas foi caracterizada pelo aparecimento de manchas de coloração negra ou avermelhada (visível).

3.4.2. OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-FR

A caracterização e determinação da impressão digital do extrato etanólico bruto (LPiE) foram realizadas através da obtenção do perfil cromatográfico obtido por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Utilizaram-se amostras padrão para comparar o tempo de retenção e o espectro no ultravioleta destas com o extrato LPiE, pelo método do padrão externo (Figura 4.3, pág. 61 e Tabela 4.2, pág. 62).

3.4.2.1. Preparo das amostras

As amostras foram pesadas diretamente em frascos do tipo safe lock (ependorf) e solubilizadas em metanol grau HPLC (1 mg/mL), com auxílio de banho ultrassom, durante 20 minutos, até a completa solubilização. As amostras foram filtradas em microfiltro Millipore Millex® unidade filtrante com poro 0,22 µm. Foram injetados 25 µL de forma automática no equipamento RP-HPLC Waters®, e os cromatogramas foram obtidos.

3.4.2.2. Condições cromatográficas

Para a obtenção dos perfis cromatográficos empregou-se uma pré-coluna Waters Symmetry® C18 (22 mm x 4,6 mm x 5 µm) e uma coluna Waters Spherisorb® C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm). Durante análise das amostras por CLAE-FR, os espectros no ultravioleta foram detectados em 254 nm “on-line”. O fluxo empregado foi de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida constante a 35° C. A eluição foi feita em gradiente crescente de metanol + 1% solução 3,33 x 10⁻² M de H₃PO₄ e solução 3,33 x 10⁻⁴ M de H₃PO₄ (Tabela 3.1). Foram empregados solventes grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 3.1 - Gradiente de eluição empregado na obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR. Bomba A: solução 3,33 x 10⁻⁴ M de H₃PO₄. Bomba B: metanol + 1% de solução 3,33 x 10⁻² M de H₃PO₄.

Tempo (min)	Bomba A	Bomba B
0	80	20
20	60	40
30	50	50
40	10	90
50	20	80
55	80	20
60	80	20

3.4.3. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE LPiE

O extrato etanólico bruto (LPiE, 62,0 g) foi submetido a cromatografia em coluna de filtração em sílica gel utilizando-se coluna cromatográfica aberta (6,5 cm de diâmetro) e como eluentes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram obtidas quatro frações: hexânica (LPiH), diclorometânica (LPiD), acetato de etila (LPiA) e metanólica (LPiM), como mostrado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Frações de *L. pinaster* obtidas da coluna de filtração de **LPiE**.

Código	Eluente	Frações	Massa (g)	Rendimento (%)
LPiH	Hexano	1-9	0,6	0,97
LPiD	Diclorometano	10-19	9,4	15,16
LPiA	Acetato de etila	20-31	26,0	41,93
LPiM	Metanol	32-44	26,0	41,93
Total			62,0	99,99

3.5. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

3.5.1. ANIMAIS

Os camundongos *Swiss* (256) utilizados nos experimentos foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Ouro Preto e mantidos no Biotério da Escola de Farmácia da mesma instituição até a realização dos experimentos. Estes animais foram mantidos em gaiolas em grupos de cinco, aclimatizados em sala com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas e com ração e água “*ad libitum*”. Para os experimentos na qual a administração das soluções foi realizada por via oral, os animais foram mantidos em jejum num período de doze horas antes do início dos experimentos com água “*ad libitum*”. Para os estudos das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva foram utilizados oito camundongos *Swiss* albinos machos ($30 \pm 5 \text{ g}$) para cada uma das formulações testadas. Para a avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* 112 camundongos *Swiss* albinos de ambos os sexos, pesando entre 25 a 30 g, foram distribuídos em grupos de acordo com o sexo, a dose do extrato e o tempo após administração dos compostos. Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFOP, sendo aprovados em ata datada de março de 2008. Protocolo nº 06/2009.

3.5.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

Para a avaliação da toxicidade e da atividade antinociceptiva, o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* foi solubilizado em DMSO, Tween 80 e água destilada na proporção de 1:1:8 e foram preparadas soluções nas concentrações de 12,5; 25; 50 e 75 mg/mL. Sabendo-se que o

volume máximo de administração, por via oral, para roedores é de 1 mL de solução para cada 100 g de peso corporal (PAIVA et al., 2005), as doses utilizadas foram: 125; 250; 500 e 750 mg/kg correspondendo respectivamente às concentrações anteriores.

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* e suas frações diclorometânica, acetato de etila e metanólica foram solubilizados em glicerina e etanol (PA) na proporção de 1:1 obtendo-se a concentração de 333 mg/mL.

3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

3.6.1. PREPARAÇÃO DO EMULGEL

Esta formulação foi preparada no Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da UFOP sob a supervisão da prof^a. Dr^a. Vanessa C. F. Mosqueira.

Composição:

Polawax.....	4%
Natrozol.....	7%
Propilenoglicol.....	2%
Coco caprilato caprato.....	3%
Parafina líquida (óleo mineral).....	2%
Álcool estearílico.....	4%
Trietanolamina.....	q.s.
Solução conservante Nipagin/Nipazol.....	2%
Água destilada.....	q.s.p. 100g

Os componentes da fase oleosa foram colocados em um béquer e essa mistura foi colocada em banho-maria. Os componentes da fase aquosa foram colocados em outro béquer e aquecidos. Após a fusão completa dos componentes da fase oleosa e o aquecimento da fase aquosa à 60° C, verteu-se a fase aquosa na oleosa e levou-se essa mistura a um agitador mecânico a 500 rpm. Esperou-se o resfriamento até 40° C para adição da trietanolamina. Completou-se o peso com água destilada q. s. p. 100 g.

O extrato etanólico bruto e suas frações na concentração de 333 mg/mL foram incorporados em emulgel e obtidas as concentrações de 5% e 1%.

3.6.2. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO SUBPLANTAR DE CARRAGENINA

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória, foi empregado o método de edema de pata induzido pela carragenina descrito por Winter e colaboradores, 1962, com modificações. Antes de qualquer tratamento, as patas posteriores (direita e esquerda) dos animais foram mensuradas. Um volume de 0,02 mL de um agente flogístico (carragenina 0,1% em salina) foi aplicado na região subplantar da pata direita posterior dos camundongos e a pata esquerda foi submetida apenas a introdução da agulha (Sham) (Figura. 3.1).



Figura 3.1 - Aplicação de carragenina na região subplantar.

Os extratos e frações de *L. pinaster* incorporados em emulgel (0,4 g) foram administrados topicamente, com auxílio de uma espátula, logo após a injeção de carragenina ou a introdução da agulha na pata do animal. Foram utilizados dois grupos padrão, um que recebeu o medicamento referência (diclofenaco de dietilamônio – 11,6 mg/g, cataflam emulgel da Novartis) e o outro que recebeu o diclofenaco de dietilamônio, obtido da Farmácia de Manipulação Aviar – Mariana/MG, e incorporado na mesma dose do anterior no emulgel preparado. No grupo controle foi aplicado o emulgel base. O paquímetro foi utilizado para mensurar os edemas das patas dos animais. O método de mensuração do edema de pata pelo paquímetro utilizado neste estudo foi validado por Guzzo, 2007.

Para garantir o contato da formulação com o local onde foi induzido o edema, foram utilizados curativos de gaze e esparadrapo do tipo micropore que impediram que os animais retirassem a formulação.

Após a administração da carragenina, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e sem acesso à ração e água durante três horas. Essas três horas correspondem ao

pico máximo de formação do edema. Após este período, as espessuras das patas foram novamente mensuradas (delineamento experimental – Figura 3.2)

A variação da espessura da pata (edema formado) foi expressa percentualmente e calculada entre o tempo zero e três horas após a administração da carragenina.

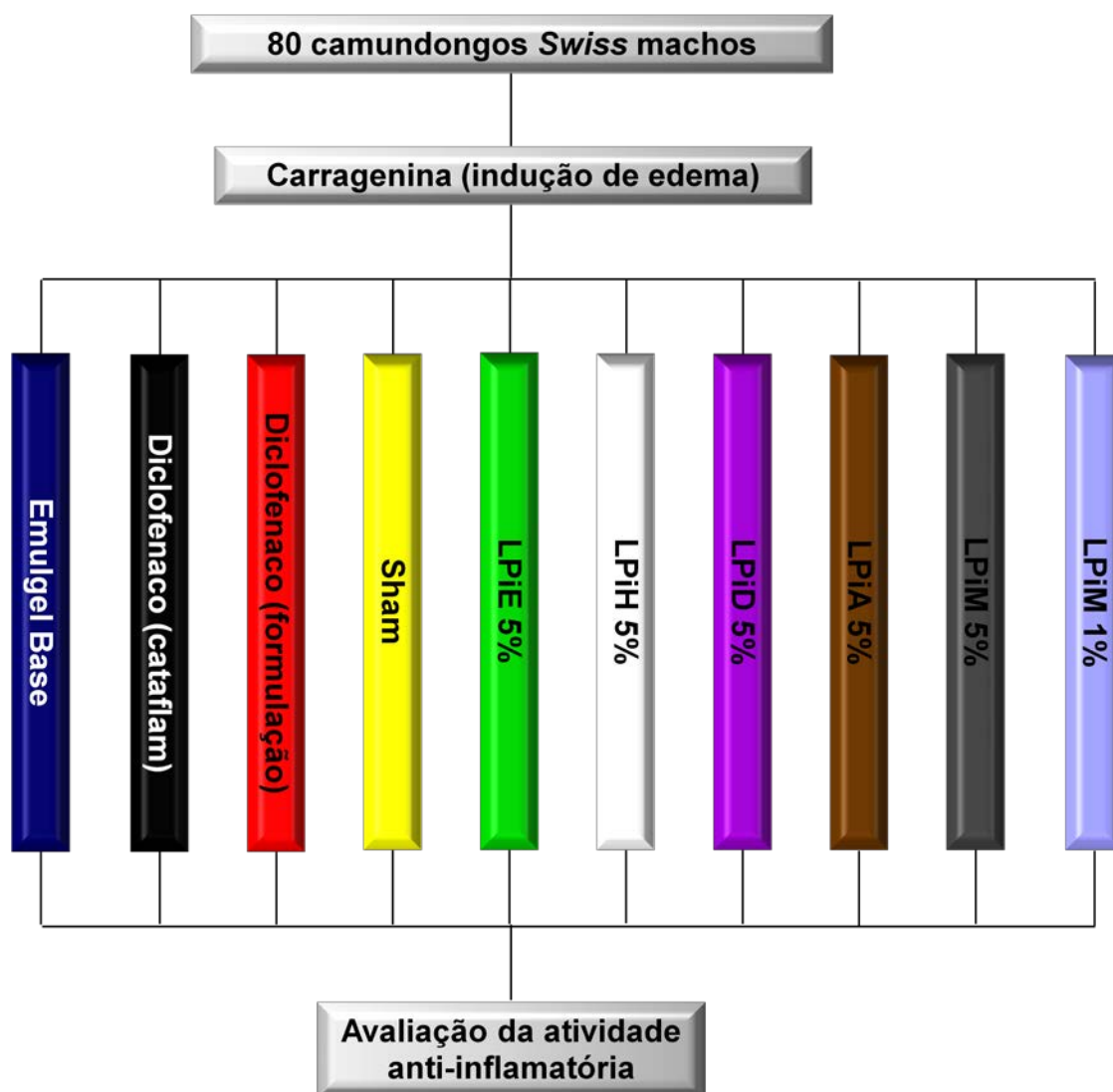


Figura 3.2 – Delineamento experimental para a avaliação da atividade anti-inflamatória pelo modelo de indução de edema por carragenina em camundongos *Swiss* machos após administração tópica do extrato etanólico bruto (LPIE) ou frações (LPIH, LPID, LPIA ou LPIM) de *L. pinaster*, de fármacos padrão (diclofenaco/cataflam ou diclofenaco/formulação) ou apenas de emulgel base. Grupo Sham inclui animais que receberam apenas injeção sem fármaco. Avaliação realizada em grupos com n = 8 machos.

3.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

Avaliação da atividade antinociceptiva foi realizada utilizando o teste da placa quente.

3.7.1. TRATAMENTOS

Os animais receberam, por via oral (p.o.) (Figura 3.3A), o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* nas doses 125; 250; 500 ou 750 mg/kg; e como controle apenas o veículo (DMSO, Tween 80 e água destilada – proporção 1:1:8). Como fármacos padrão foram utilizados: morfina 10 mg/kg (1 mg/ml) por via intraperitoneal (i.p.) (Figura 3.3B) dissolvida em solução aquosa de NaCl 0,9% ou dipirona 200 mg/kg (25 mg/ml), por via oral, dissolvida em água destilada ou indometacina 10 mg/kg (1 mg/ml), por via oral, solubilizada em 0,5% de Tween 80 em água destilada (ESTEVEES et al., 2005). A morfina foi administrada via intraperitoneal, pois a via oral está sujeita ao metabolismo de primeira passagem, sendo que somente 40 a 50% da dose administrada alcançam o SNC em 30 minutos (TRESOT et al., 2008). Após administração intravenosa, a morfina, menos lipossolúvel, alcança seu efeito máximo no SNC em 15 a 20 minutos (PLAYFOR et al., 2006; BARTOLOMÉ et al., 2007). A diminuta massa corporal dos ratos faz com que a administração intravenosa de qualquer substância seja dificultada. Assim, geralmente, as vias intraperitoneal (i.p.) e a subcutânea são as mais empregadas (CARREGARO et al., 2005). Portanto, a via intraperitoneal foi a escolhida para a administração da morfina por proporcionar absorção mais rápida que a via subcutânea.

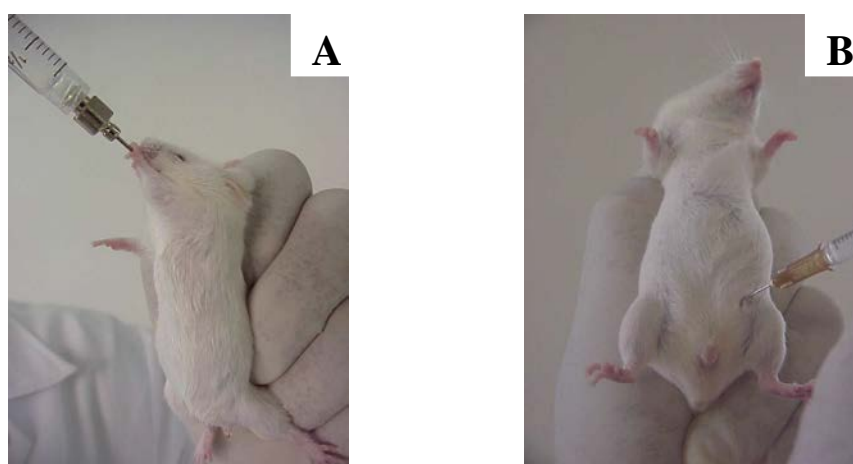


Figura 3.3 - Vias de administração dos padrões, controle e extratos.
A) Via oral; B) Injeção intraperitoneal.

3.7.2. TESTE DA PLACA QUENTE

Realizou-se o teste da placa quente utilizando-se o método descrito por Eddy e colaboradores, 1953, com modificações. A técnica consta de uma caixa metálica cheia de água, contendo no seu interior uma resistência, cujo funcionamento é regulado por termostato. Na superfície colocou-se uma placa de metal com bordas espessas. Um termômetro foi preso a esta placa metálica para que a temperatura fosse monitorada e permanecesse constante, igual a $56 \pm 1^\circ \text{C}$. Verificou-se, por meio da obtenção de dois valores basais (separados por um intervalo de 30 minutos), o tempo de latência do tratamento. Cada camundongo foi colocado individualmente sobre essa placa e o tempo (contado em segundos) em que o animal permaneceu na placa aquecida até apresentar o reflexo de morder, levantar ou lambear uma das patas (tempo de latência para a resposta nociceptiva) foi registrado utilizando cronômetro (Figura 3.4). O tempo de reação dos animais foi medido duas vezes antes da aplicação do extrato, drogas-padrão e controle. Desprezaram-se os animais com tempo de reação acima de 10 segundos(s). Os animais foram novamente testados na placa quente, 30 minutos após a administração da solução do extrato em diferentes doses (125; 250; 500 ou 750 mg/kg), das soluções padrão (morfina, dipirona ou indometacina) e da solução controle. O tempo máximo de permanência do animal sobre a placa foi de 60 segundos para evitar danos teciduais nas patas. O efeito antinociceptivo foi definido como o aumento do tempo de reação e foi calculado através da variação (Δ) dos resultados obtidos antes e após a administração das soluções (delineamento experimental, Figura 3.5).



Figura 3.4 - Camundongo sobre a placa aquecida a $56 \pm 1^\circ \text{C}$, lambendo uma das patas.

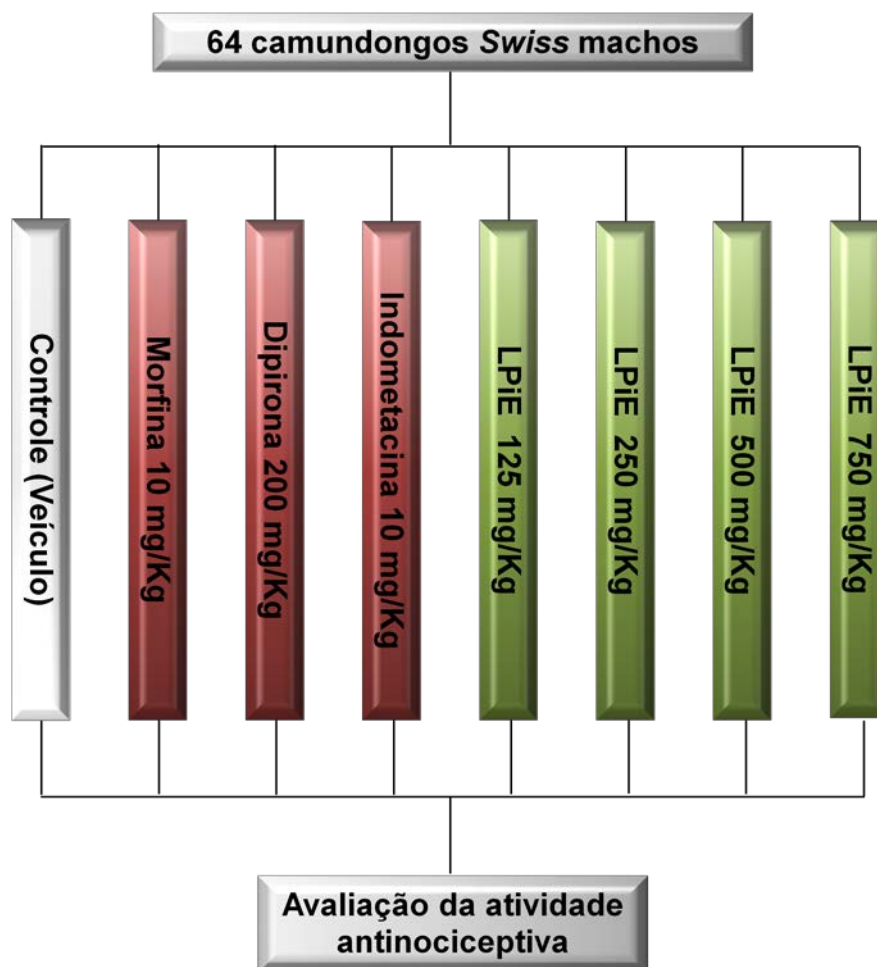


Figura. 3.5 – Delineamento experimental para a avaliação da atividade antinociceptiva pelo método da placa quente em camundongos *Swiss* machos após administração do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em quatro diferentes doses (125; 250; 500 ou 750 mg/kg de peso corporal), de fármacos padrão (morfina, dipirona ou indometacina) ou apenas de veículo (DMSO, Tween 80 e água destilada). Avaliação realizada em grupos com n = 8 machos.

3.8. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

3.8.1. TRATAMENTO

Os animais (machos e fêmeas) foram tratados oralmente com o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* nas doses 125; 250 ou 500 mg/kg e os controles tratados apenas com o veículo (DMSO, Tween 80 e água destilada – proporção 1:1:8).

3.8.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental (Figura 3.6) foi conduzido segundo as especificações da resolução nº 90 da ANVISA de 16 de março de 2004 (Guia para realizações de estudos de

toxicidade pré-clínica de fitoterápicos). Este guia preconiza que para estudos agudos deve-se utilizar a mesma via de administração proposta para o uso do produto (oral).

O protocolo experimental foi realizado utilizando-se as doses de 125; 250 ou 500 mg/kg do extrato administradas por via oral (gavagem) em dose única. O grupo controle recebeu apenas o veículo do extrato. Para este estudo foram utilizados dois procedimentos: no primeiro, os animais receberam as doses pela via indicada em dose única e foram observados a atividade locomotora (open field), o número de vezes que o animal se apóia apenas sobre as patas posteriores (rearing), tônus muscular (tração), consumo médio de ração e água e variação do peso corporal por um período de sete dias após tratamento. No sétimo dia, os animais foram anestesiados com pentobarbital (45 mg/kg, i.p.) para a coleta do sangue pela veia cava inferior por exsanguinação a fim de realizar as dosagens bioquímicas e hematológicas. Os órgãos (fígado, rins, pulmão e encéfalo) foram coletados, pesados para avaliação do peso úmido e armazenados em solução de formol tamponado para serem avaliados histopatologicamente. No segundo procedimento os experimentos foram conduzidos por quatorze dias para verificar a presença de diferenças tanto no comportamento quanto nas análises biológicas dos animais nas mesmas doses, mas em tempos diferentes.

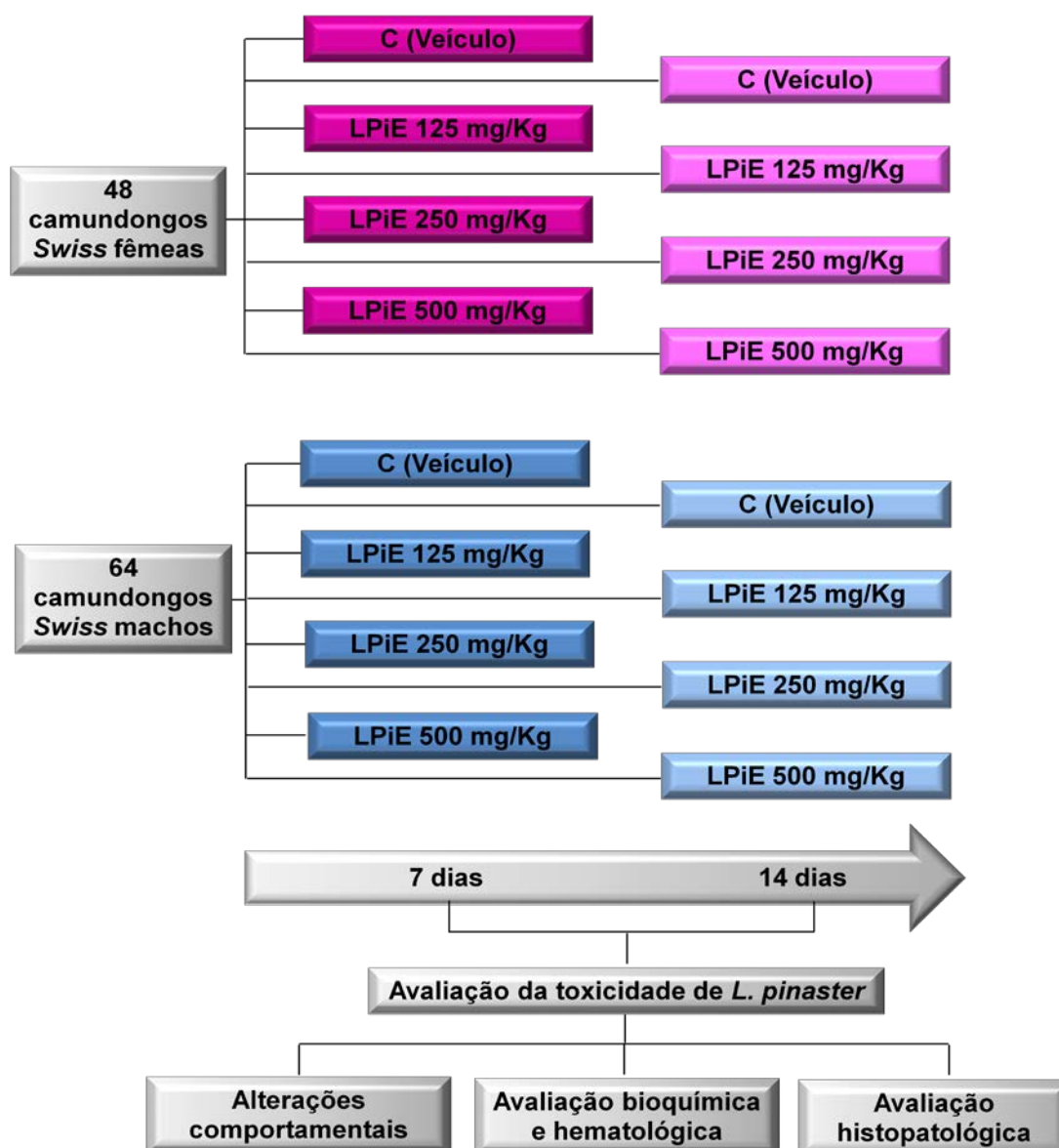


Figura 3.6 – Delineamento experimental para a avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE) administrado por via oral em 3 diferentes doses (125; 250 ou 500 mg/kg de peso corporal) em camundongos Swiss de acordo com o sexo e o tempo após tratamento. Avaliações realizadas em grupos com n = 14 (8 machos e 6 fêmeas) sem diferenciação de sexo.

3.8.3. ATIVIDADE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Foram utilizados dois métodos de avaliação *in vivo* da atividade aguda sobre o SNC: Campo Aberto (Open-field) e Tração.

3.8.3.1. MEDIDA DA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA NO TESTE DE CAMPO ABERTO (OPEN-FIELD)

O objetivo deste teste é avaliar a locomoção espontânea e a atividade exploratória do animal. O campo aberto foi proposto por Turner, 1972, e consiste na utilização de uma base medindo 100 x 80 cm contendo uma circunferência dividida em 12 espaços sobre a qual é colocado um cilindro de acrílico para delimitar o espaço do animal (Figura 3.7 A e B). Os animais foram colocados em um dos quadrantes e os seguintes parâmetros foram analisados: número de quadrantes invadidos pelo animal com as quatro patas e o número de vezes que o animal se apóia apenas sobre as patas posteriores (rearing) durante um período de 5 minutos.

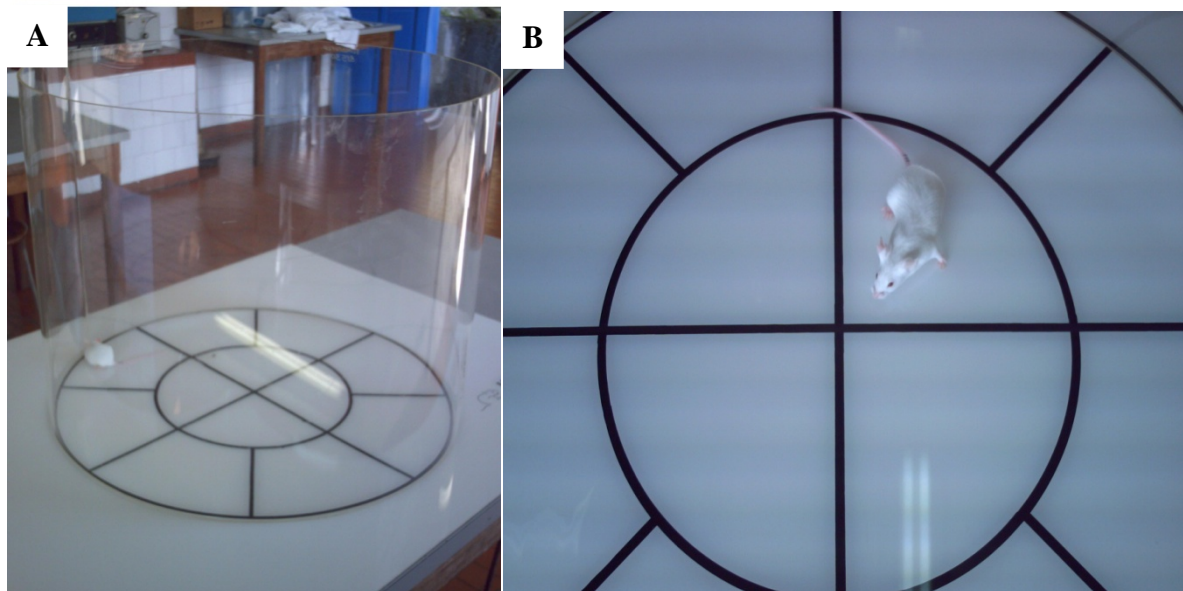


Figura 3.7 A e B - Camundongo no campo aberto

3.8.3.2. MÉTODO DE TRAÇÃO

O método de tração foi descrito por Rudzik e colaboradores, 1973, com o objetivo de avaliar alterações do tônus muscular. O aparelho de tração consiste de um pequeno fio metálico rígido esticado e sustentado por duas barras laterais a 30 cm de altura do apoio (Figura 3.8). Observou-se a capacidade de cada animal de se prender e sustentar no fio metálico com as patas dianteiras e quando livre a habilidade de colocar pelo menos uma das patas posteriores sobre o fio dentro de 5 segundos.



Figura 3.8 - Camundongo no aparelho de tração.

3.8.4. AVALIAÇÃO DO CONSUMO MÉDIO DE ÁGUA E RAÇÃO E VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Os consumos de água e ração foram avaliados um dia antes do início do tratamento e a cada 3 dias após a administração do extrato e contabilizados por grupo (sexo/dose), registrando-se os valores médios de cada grupo. Durante todo o experimento, o consumo diário de ração foi estimado pela diferença de peso entre a ração colocada em um dia (200,0 g) e o restante no dia seguinte. Para estimar o consumo diário de água foram colocados 300,0 mL e no dia seguinte mediu-se a sobra de água. Para essas medidas utilizou-se uma balança semi-analítica e proveta de 500 mL. A pesagem e a aferição do volume foram realizadas no mesmo horário dentro de 24 horas.

O peso corporal de cada animal foi avaliado um dia antes de se iniciar o tratamento, no quarto dia do estudo, no sétimo dia (dia de sacrifício dos animais do primeiro procedimento -7 dias) e para o segundo procedimento (14 dias), além dos dias do primeiro procedimento, os animais também foram pesados no décimo primeiro e décimo quarto dia (dia do sacrifício).

3.8.5. AVALIAÇÃO DOS PESOS ÚMIDOS DOS ÓRGÃOS

Após a retirada do sangue, os órgãos foram rapidamente removidos e lavados com salina 0,9% e pesados ainda úmidos em balança semi-analítica. A análise foi realizada comparando-se o grupo controle com os grupos das doses administradas. O peso relativo dos órgãos (PR) de cada animal foi então calculado segundo a fórmula:

$$\text{PR} = \frac{\text{Peso \acute{o}rg\~{a}o absoluto (g)}}{\text{Peso corporal do animal no dia do sacrif\~{i}cio (g)}} \times 100$$

3.8.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os animais dos dois procedimentos (sete e quatorze dias) que receberam as doses 125; 250 ou 500 mg/kg e os controles foram anestesiados com pentobarbital (45 mg/kg, i.p.). Coletou-se 0,3 mL de sangue de todos os animais da veia cava inferior. As amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf contendo 0,005 mL de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% para a realização de exames hematológicos. As amostras coletadas foram imediatamente imergidas em banho de gelo a fim de preservar a morfologia e o número de células para a contagem. O sangue total foi diluído em salina (1:2) e os parâmetros hematológicos avaliados utilizando aparelho de contagem eletrônica (ABX diagnostics, micros 60) do Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC-UFOP). Foi realizada contagem de eritrócitos, determinação do hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), parâmetros estes da série vermelha do hemograma. A série branca foi determinada através da contagem global de leucócitos utilizando o mesmo aparelho e a contagem diferencial de leucócitos por extensão sanguínea fixada e corada por coloração panótica rápida (Instant Prov). A contagem de plaquetas foi também determinada no mesmo aparelho. A contagem diferencial foi realizada utilizando objetiva de 100X, com óleo de imersão para a visualização das células, no microscópio Olympus CX 21 do LAPAC, UFOP.

3.8.7. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Juntamente com a coleta de sangue para as dosagens hematológicas, foi coletado 1,0 mL de sangue de cada animal, este foi acondicionado em tubos plásticos (eppendorf) sem anticoagulante e imerso imediatamente em banho-maria para que a coagulação fosse mais rápida e para evitar hemólise. O sangue foi centrifugado a 13.000 rpm durante 30 minutos no equipamento Centrifuge 5415D do Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanotecnologia da UFOP. O soro obtido foi armazenado a -4° C e depois utilizado para as dosagens bioquímicas.

As determinações dos níveis séricos de uréia, ácido úrico, creatinina, amilase, AST (TGO), ALT (TGP), fosfatase alcalina e proteínas totais foram realizadas no Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC) da Universidade Federal de Ouro Preto.

3.8.8. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram eutanasiados por exsanguinação com anestesia no sétimo ou 14º dia após tratamento. Durante a necropsia foram coletadas amostras do fígado, rins, pulmões e encéfalo. Os órgãos foram fixados em solução de formol a 10% tamponado (pH=7,2) (item 3.10.8.1) com o objetivo de preservar a morfologia e a composição do tecido até a confecção das lâminas no Laboratório de Imunopatologia, NUPEB, UFOP sob a colaboração da professora Dr^a Cláudia Martins Carneiro. Após fixação, os tecidos foram processados rotineiramente e incluídos em parafina. A cada animal foi dado um código que apenas foi revelado ao final de todas as análises.

3.8.8.1. PREPARO DO FORMOL PARA FIXAÇÃO

Para fixar tecidos moles, o formol foi empregado na concentração de 10% em solução isotônica e tamponada, para tanto foi diluído como abaixo:

Formol puro (formol 40% PA).....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Fosfato de sódio monobásico.....	4,0 g
Fosfato de sódio dibásico.....	6,5 g

3.8.8.2. DESIDRATAÇÃO, DIAFANIZAÇÃO E INCLUSÃO EM PARAFINA

Os tecidos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90% e absoluto) sendo que os fragmentos permaneceram imersos por um período de 20 minutos em cada álcool. Após a etapa de desidratação, foi realizado o processo de diafanização, que tem como objetivo tornar o tecido translúcido. A diafanização consistiu em submeter os fragmentos a dois banhos de xilol com duração de 10 minutos cada. Posteriormente, os tecidos foram impregnados e incluídos em parafina, utilizando dois banhos para que ocorresse penetração nos vasos sanguíneos e espaços intercelulares. Foram confeccionados blocos contendo cada um os órgãos de cada animal.

3.8.8.3. MICROTOMIA

Os blocos de parafina, contendo os fragmentos dos órgãos, foram submetidos à microtomia, sendo obtidos dois cortes seriados com 4 µm de espessura. Cada corte foi colocado em banho-maria para que as fitas fossem esticadas e posteriormente sobre as lâminas de vidro que foram em seguida colocadas na estufa (60° C) para secagem.

3.8.8.4. COLORAÇÃO (HEMATOXILINA-EOSINA)

Os cortes foram submetidos a coloração com Hematoxilina-Eosina para análise geral das alterações histopatológicas.

O processo de coloração se iniciou com a imersão das lâminas em dois banhos de xilol, de duração de 15 minutos cada, para desparafinização. Em seguida estas lâminas foram imersas em banhos de álcool absoluto, álcool 90%, álcool 80%, álcool 70%, e água sendo cada um dos banhos de 5 minutos para re-hidratação. Após a re-hidratação, as lâminas foram imersas no corante Hematoxilina (corante ácido) por 10 minutos, em seguida lavadas em água corrente por 5 minutos. A seguir foi feita a diferenciação com a passagem rápida das lâminas em álcool-acidulado. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos. Finalizada esta etapa, as lâminas foram imersas no corante eosina (corante básico), por 30 segundos, e em seguida lavadas em água corrente por 1 minuto. Logo após, as lâminas foram imersas em três banhos de álcool absoluto rapidamente e levadas à estufa a 60° C por alguns minutos para secagem. Depois de secas, as lâminas foram imersas em xilol e montadas com Entellan (Merck) e lamínula.

3.8.8.5. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica consiste na avaliação das secções histológicas obtidas dos órgãos a fim de se verificar possíveis alterações provocadas pelo tratamento, tais como presença de infiltrado inflamatório, espessamento, necrose e apoptose celular, entre outros.

Os cortes corados por HE foram avaliados qualitativa e quantitativamente. As análises qualitativas foram realizadas nos diferentes órgãos (fígado, rins, pulmões e encéfalo) utilizando-se as objetivas de 10 e 40X do microscópio Olympus BX50, pentaocular localizado na Escola de Farmácia, UFOP, a fim de verificar alterações teciduais e presença de aglomerados de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). O infiltrado inflamatório no fígado foi quantificado em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6$

μm^2) utilizando-se a objetiva de 40X. A análise morfométrica do infiltrado inflamatório neste órgão foi realizada em imagens digitais obtidas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000 B e todas as imagens foram analisadas pelo software de análise e processamento de imagem Leica Qwin no Laboratório Multiusuários do NUPEB, UFOP. O processo inflamatório foi determinado pelo número de núcleos celulares presentes nos tecidos analisados e os animais tratados com as diferentes doses de LPiE com valores da quantificação nuclear acima da média observada nos animais não-tratados \pm erro padrão foram considerados com inflamação.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) com $n \geq 6$ para cada grupo experimental. Os resultados foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) seguida do teste de *Dunnet* para análise dos grupos teste em relação ao grupo controle. Para avaliar a locomoção dos animais no campo aberto e o número de rearing, foi utilizado o teste t e para o método de tração os resultados foram expressos em porcentagem de animais que não obtiveram êxito no teste e a significância estatística foi avaliada pelo teste exato de Fisher. Para a análise morfométrica do fígado foi utilizada a análise de variância (One-way ANOVA) seguida do teste de *Tukey*. Para todas as análises foi adotado intervalo de confiança de 95%, sendo que as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor ou igual a 0,05 ($P \leq 0,05$). Todas as análises estatística utilizaram o Software GrafPad Prisma 5.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

O extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE) obtido por percolação exaustiva com etanol (PA) das partes aéreas seca e triturada apresentou um rendimento de 12,4% (p/p). O rendimento extrativo foi calculado pela razão da massa do extrato etanólico seco pela massa do material vegetal coletado (Figura 4.1).

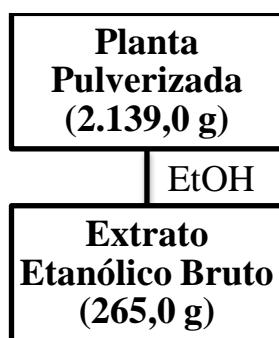


Figura 4.1 – Obtenção do extrato etanólico bruto das partes aéreas de *L. pinaster*.

4.2. ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO

A presença de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico bruto (LPiE) foi avaliada qualitativamente por CCD, utilizando reveladores específicos (WAGNER et al., 1984). Foram avaliadas as presenças de fenilpropanóides, flavonóides, antraquinonas, terpenóides, saponinas, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos e alcalóides. Entre as classes avaliadas somente cumarinas, heterosídeos cardiotônicos e alcalóides não foram detectados, conforme a Tabela 4.1. Esta análise qualitativa é de fundamental importância para a ação farmacológica de acordo com cada substância presente para que haja uma correlação entre atividades biológicas.

As substâncias aglicônicas e os respectivos heterosídeos comportam-se no ensaio de Bornträeger de maneira diferente em solução e em presença de reagente alcalino, como revelam as cores das soluções obtidas. As substâncias 1,8- hidroxiantraquinônicas exercem efeito mesomérico acentuado, decorrentes dos grupos carbonilas. Este estado de mesomeria é alcançado pela formação de uma ponte de hidrogênio, resultado de um sistema de quatro anéis. Em solução, as moléculas absorvem a luz num comprimento de onda próximo a 430 nm, apresentando cor amarela-laranja. A cor vermelha observada na reação de Bornträeger deve-se à ionização das hidroxilas fenólicas, o que produz uma maior ressonância molecular. Os máximos de absorção deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (cerca

de 520 nm) e as soluções alcalinas mostram-se coradas de vermelho. Nos monoglicosídeos, em virtude de uma hidroxila se encontrar bloqueada, o efeito mesomérico é diminuído, assim o máximo de absorção retrocede para menores comprimentos de onda (cerca de 490 nm) e a solução aparece corada de laranja avermelhada. Nas antronas, não se acentuam os fenômenos de ressonância e as suas soluções em meio alcalino produzem apenas uma cor amarela. Essa cor, obtida nos ensaios positivos da reação de Borntræger, desaparece depois da adição de pó de alumínio e de KOH, pela redução das formas oxidadas. Mas, basta agitar o tubo para se reoxidarem ao ar, readquirindo a cor vermelha (SOUZA et al., 2003).

Dependendo do grau de acidez ou alcalinidade, as antocianidinas adotam diferentes estruturas químicas. Cada uma dessas estruturas apresenta absorção característica na região do espectro visível (BROUILLARD & DUBOIS, 1977). As modificações estruturais das antocianidinas em água são devidas à alta reatividade da aglicona. Em meio ácido e temperatura de 25° C, quatro estruturas coexistem em equilíbrio: o cátion flavilium (AH^+), a base quinoidal (A), a pseudo base ou carbinol (B) e a chalcona (C). Entretanto, somente o cátion flavilium e a base quinoidal apresentam coloração, o carbinol e a chalcona são incolores (Figura 4.2).

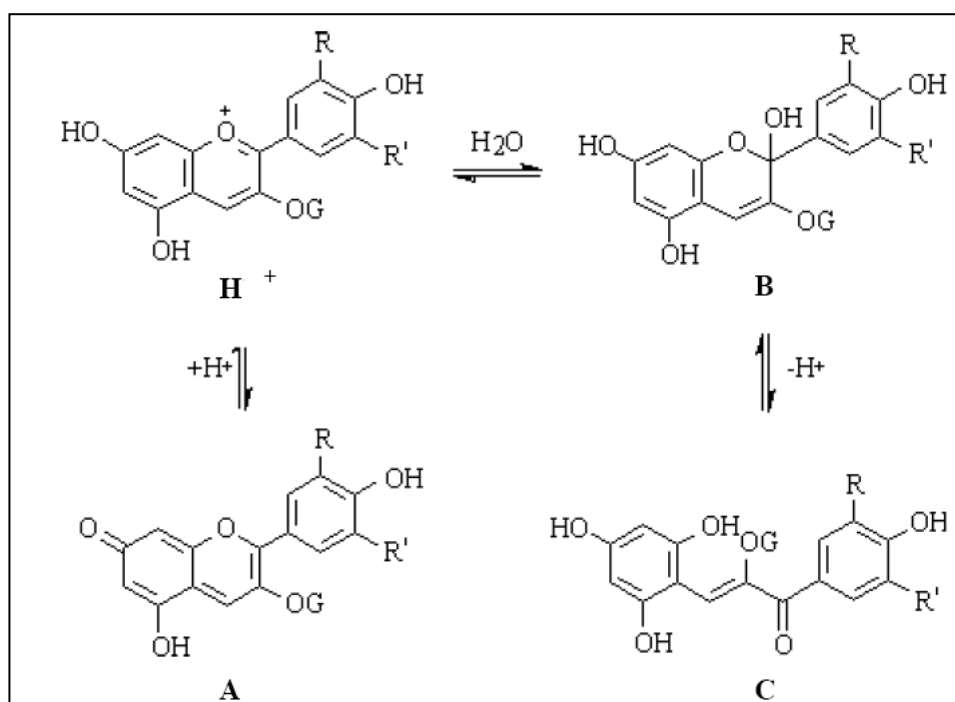


Figura 4.2 - Estruturas que coexistem em equilíbrio no meio ácido (Adaptado de BROUILLARD & DUBOIS, 1977).

Tabela 4.1 - Identificação qualitativa dos metabólitos secundários do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* Mart.

Classe de Metabólitos Secundários	Resultados do teste	Dados descritos na literatura
Fenilpropanóides	+	Sim (Duarte, 1999; Silveira et al., 2005)
Flavonóides	+	Sim (Oliveira et al., 1996; Duarte, 1999; Silveira et al., 2005)
Antraquinonas	+	Sim (Pinheiro, 2002)
Terpenóides	+	Sim (Duarte, 1993; Oliveira et al., 1996; Pinheiro, 2002; Silveira et al., 2005)
Saponinas	+	Sim (Pinheiro, 2002)
Cumarinas	-	Não
Heterosídeos cardiotônicos	-	Não
Alcalóides	-	Não

Legenda: (-) ausência

(+) presença

Estes resultados corroboram com os dados da literatura que indicam a presença de flavonóides, triterpenóides, lactonas sesquiterpênicas, fenilpropanóides (ácidos cafeoilquínicos) (BORELLA et al., 1998; DUARTE, 1999; JORDÃO, 2003; FERREIRA et al., 2005; GRAEL et al., 2005; SANTOS et al., 2005; GOBBO-NETO et al., 2008) nas espécies de *Lychnophoras*. Estas substâncias são marcadores taxonômicos da subtribo *Lychnophorine*, tribo *Vernoniae* (HARBORNE et al., 1977; BOHLMANN & JAKUPOVIC, 1990). Muitas dessas substâncias, provavelmente, tem função de proteção contra a alta insolação e radiação ultravioleta (ROTH, 1995) e repelem herbívoros durante o crescimento vegetativo (CROTEAU & JOHNSON, 1984) sendo importantes na adaptação à ambientes xéricos (FAHN, 1986).

De modo geral, os metabólitos secundários que mais se destacaram na espécie *L. pinaster* foram os flavonóides, terpenóides e fenilpropanóides, conforme Tabela 4.1. Nos estudos de atividades biológicas desta espécie verificou-se que o extrato etanólico bruto demonstrou atividade citotóxica frente à *Artemia salina* (FERRAZ- FILHA, 2008) e atividade tripanossomicida devido à presença de lactonas sesquiterpênicas (terpenóides) como o ácido licnofóico (OLIVEIRA et al., 1996). As LSTs são metabólitos secundários conhecidos por apresentarem atividade citotóxica (KUPCHAN et al., 1971; LE QUESNE et al., 1976;

CANALLE et al., 2001; SCOTTI et al., 2007). Além dessas atividades, testes de atividade anti-inflamatória realizados com o extrato bruto de *L. pinaster* mostraram uma alta atividade inibitória da xantina oxidase *in vitro* (FERRAZ-FILHA et al., 2006) e uma atividade anti-edematogênica significativa no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (GUZZO et al., 2008). Propriedades analgésicas também foram demonstradas no extrato bruto desta espécie (GUZZO et al., 2008). Estes testes mostram que as atividades podem estar relacionadas à presença de flavonóides, terpenóides e fenilpropanóides.

Os compostos fenólicos são tóxicos aos patógenos e são produzidos rapidamente na defesa do vegetal e se acumulam após a infecção, especialmente em variedades resistentes. Os flavonóides, taninos, ácidos clorogênico e caféico são exemplos de alguns desses compostos (CAMPOS et al., 2004).

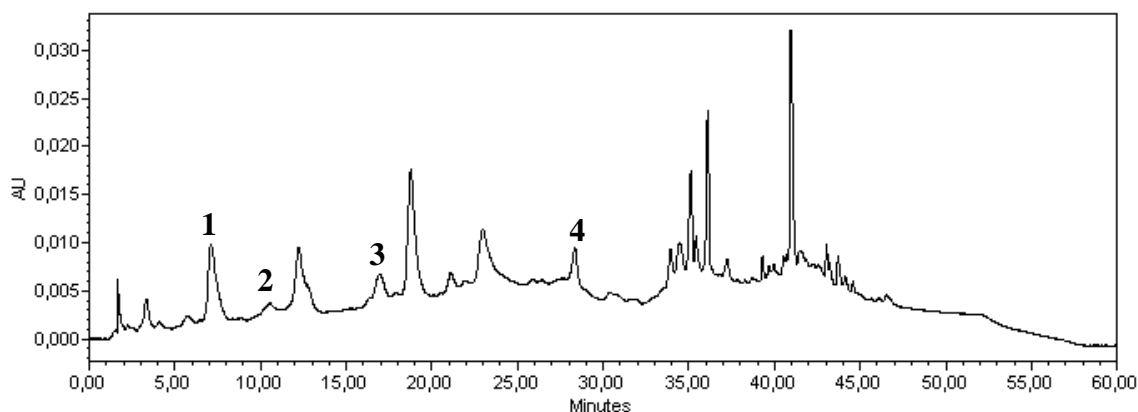
Diversas atividades como: hemolítica, moluscicida, anti-inflamatória, antifúngica, antimicrobiana, antiparasitária, antitumoral e antiviral têm sido associadas às saponinas (SPARG et al., 2004). Santos e colaboradores, 2001, conseguiram isolar uma saponina diglicosilada, a chikusetsusaponina, pela primeira vez revelando a ocorrência desta classe de compostos na espécie *Lychnophora ericoides* Mart. Rattanathongkom e colaboradores, 2009, demonstraram que a chikusetsusaponina é um potente agente contra a replicação viral.

4.3. OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE-FR

A técnica de CLAE pode ser útil na determinação da impressão digital de diversas espécies vegetais. Isso traz uma grande quantidade de informações, incluindo autenticidade da amostra, determinação de marcadores taxonômicos, identificação de constituintes padrões relacionados com a localidade da planta, suporte para estudos genéticos (espécies híbridas), diferenças entre espécies que possuem semelhanças anatômicas e atividades biológicas relacionadas ao perfil fitoquímico (ABOURASHED et al., 2003).

A caracterização das substâncias presentes no extrato etanólico bruto (LPiE) *L. pinaster* foi realizada por CLAE, utilizando o método de padrão externo. O cromatograma da amostra (LPiE) foi comparado aos cromatogramas de padrões, tais como ácido caféico (1), ácido clorogênico (2), quercetina (3) e vitexina (4). Os parâmetros para a caracterização das substâncias presentes foram o tempo de retenção (TR) e o espectro no ultravioleta obtido para aquele determinado pico.

O cromatograma do extrato etanólico bruto (LPiE) está representado a seguir, na Figura 4.3 e as substâncias identificadas com seus respectivos tempos de retenção (em minutos) estão apresentadas na Tabela 4.2.



Condições de análise: A: solução $3,33 \times 10^{-4}$ M de H_3PO_4 ; B: metanol + 1% de solução $3,33 \times 10^{-2}$ M de H_3PO_4 ; 0 min.: 80:20; 20 min.: 60:40; 30 min.: 50:50; 40 min.: 10:90; 50 min.: 20:80; 55 min.: 80:20; 60 min.: 80:20.

Pré-coluna Waters Symmetry® C18 (22 mm x 4,6 mm x 5 μ m), coluna Waters Spherisorb® C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μ m). Fluxo: 1,0 mL/min. Temperatura da coluna: 35° C

Figura 4.3 - Cromatograma do extrato etanólico bruto (LPiE) de *L. pinaster* (fingerprint).

Os cromatogramas dos padrões, ácido caféico (**azul**), ácido clorogênico (**verde claro**), quercetina (**rosa**) e vitexina (**azul claro**), foram plotados no mesmo eixo do cromatograma do extrato etanólico bruto (LPiE) para a comparação dos tempos de retenção (Figura 4.4). Como o extrato possui apenas picos de baixa intensidade no comprimento de onda analisado, não foi possível sua visualização, podendo apenas verificar a presença dos padrões.

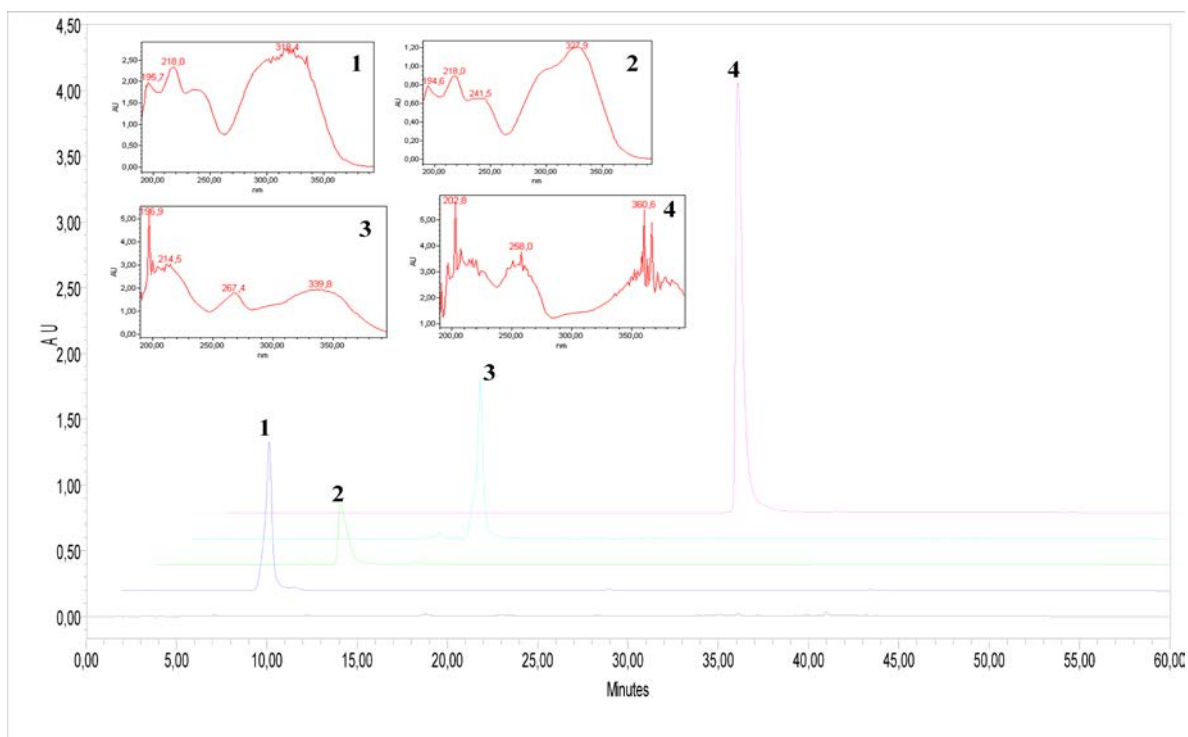
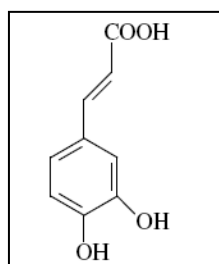


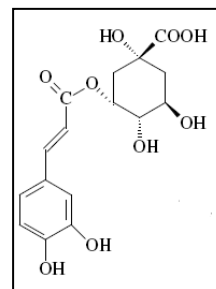
Figura 4.4 – Cromatogramas representando o perfil de LPiE (■), padrão ácido caféico (■), padrão ácido clorogênico (■), padrão vitexina (■) e padrão quercetina (■) em CLAE-FR [coluna Waters Spherisorb® C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 μm); Solvente A: solução $3,33 \times 10^{-4}$ M de H_3PO_4 ; Solvente B: metanol + 1% de solução $3,33 \times 10^{-2}$ M de H_3PO_4 ; Gradiente: 80% de A em 0 min, 60% de A em 20 min, 50% de A em 30 min, 10% de em 40 min, 20 de A em 50 min, 80% de A em 55 min, 80% de A em 60 min; fluxo de 1,0 mL/min, $\lambda = 254$ nm] e espectros no UV.

Tabela 4.2 - Comparação entre os tempos de retenção (TR) das substâncias utilizadas como padrões e aqueles observados no extrato etanólico bruto (LPiE) de *L. pinaster*.

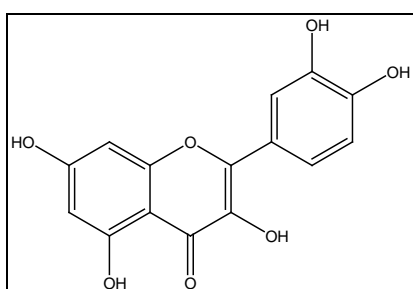
Substância	TR (min.)	
	Padrão	LPiE
Ácido caféico (1)	8,20	7,11
Ácido clorogênico (2)	10,21	10,51
Vitexina (3)	16,00	16,35
Quercetina (4)	28,33	28,35



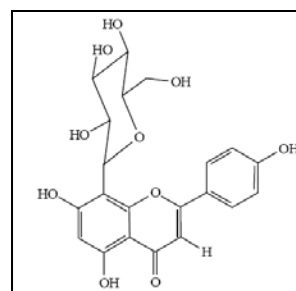
(1) Ácido caféico



(2) Ácido clorogênico



(3) Quercetina



(4) Vitexina

A comparação dos tempos de retenção do extrato etanólico bruto (LPiE) com amostras autênticas levaram à caracterização de compostos fenólicos mostrados na Tabela 4.2, exceto do ácido caféico. Somente os picos que mostraram tempo de retenção semelhante aos padrões foram considerados.

4.4. ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

4.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Compostos derivados de plantas possuem valor histórico como fontes de agentes anti-inflamatórios. Desta forma, a busca por novas drogas que interfiram efetivamente com os processos inflamatórios é de grande importância (CALIXTO et al., 2003; 2004).

Devido ao uso popular da espécie *L. pinaster* como anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, para traumatismos, reumatismos, contusões e picadas de insetos (RODRIGUES et al., 2001), foi avaliada a atividade anti-inflamatória tópica *in vivo* do extrato etanólico bruto (LPiE) e de suas quatro frações na concentração de 5% com o objetivo de descobrir a fração mais ativa.

Entre os diversos métodos utilizados para investigar o efeito anti-inflamatório de drogas, incluindo produtos naturais, o mais comumente empregado é o modelo de inflamação

que usa como agente flogístico a carragenina injetada na pata traseira de ratos (WINTER et al., 1962; VINEGAR et al., 1969; CRUNKHORN & MEACOCK, 1971; HENRIQUES et al., 1987; MORRIS, 2003; SULEYMAN et al., 2003; POSADAS et al., 2004; ARYA & KUMAR, 2005). Este modelo permite avaliar o potencial anti-inflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de vários agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (GÁBOR, 2000; DE YOUNG et al., 1989). Além disso, quando o objetivo é o desenvolvimento de medicamentos de uso tópico, esse modelo oferece ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma permeação cutânea apropriada de forma a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico (BOUCLIER et al., 1990).

A injeção subplantar de carragenina induz um aumento agudo e progressivo do volume da pata dos animais. O edema, que é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constitui-se em parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória (PEREIRA et al., 2006). Este modelo de inflamação envolve a liberação de vários mediadores que induzem a reação inflamatória em fases distintas (VINEGAR et al., 1969; DI ROSA et al., 1971a, 1971b, DI ROSA, 1972 ; HENRIQUES et al., 1987; SÜLEYMAN & BÜYÜKOKUROĞLU, 2001; MORRIS, 2003). Durante a primeira hora, o edema de pata induzido por carragenina deve-se ao trauma da injeção. Na fase inicial (60-90 min) ocorre a liberação de histamina e serotonina. A fase intermediária (aumento da permeabilidade vascular) é mantida por cininas (principalmente a bradicinina produzida pela calicreína) que ocorre no período de 90-150 minutos. A fase final (150 min-6h) está correlacionada à elevada produção de prostaglandinas e produtos da atividade da ciclooxigenase que atuam na resposta inflamatória (PERIANAYAGAM et al., 2006), principalmente os produtos da ciclooxigenase-2 (COX-2) (SEIBERT et al., 1994). Nesta última fase da reação inflamatória as prostaglandinas desempenham ação principal caracterizada por hiperalgesia, migração de leucócitos e edema pronunciado, com pico entre a terceira e quarta hora (HENRIQUES et al., 1987; ARYA & KUMAR, 2005). As cininas e as prostaglandinas são apontadas como as principais substâncias desencadeantes deste edema (VANE & BOLTING, 1995; VINEGAR et al., 1987). A Tabela 4.3 apresenta os resultados do teste de edema de pata induzido por carragenina utilizando o Cataflam Emulgel® (diclofenaco de dietilamônio 11,6 mg/g) e diclofenaco de dietilamônio incorporado em emulgel como controles positivos. O diclofenaco é um anti-inflamatório não-esteroidal com baixa seletividade para a COX-2 (CRYER &

FELDMAN, 1998), classicamente utilizado em modelos animais da inflamação (SÜMEN et al., 2001). No edema induzido por carragenina, a COX-1 predomina nas primeiras duas horas seguido do predomínio da COX-2 na terceira hora do estímulo (SEIBERT et al., 1994; TORIYABE et al., 2004). O diclofenaco afeta indistintamente, ambas as isoformas de COX sendo mais eficiente na modulação do edema inflamatório quando comparado às drogas seletivas da COX-2 (CAVALCANTE, 2007). Por ser um inibidor da COX, conseqüentemente, reduz a produção de PGs evitando a potencialização exercida pelo efeito vasodilatador destes mediadores lipídicos reduzindo, assim, o edema inflamatório (TULUNAY, 2000).

Tabela 4.3 - Variação percentual (%) da espessura das patas dos animais após injeção de carragenina ou introdução da agulha na pata (sham) e tratamento tópico

Tratamento tópico	Variação da espessura das patas (%)
Emulgel base	36,13 ± 1,08
Diclofenaco (Cataflam®)	6,92 ± 0,51 *
Diclofenaco (Formulação)	5,18 ± 1,02 *
Sham	3,10 ± 0,59 *
LPiE (5%)	12,35 ± 2,24 *
LPiH (5%)	10,61 ± 1,53 *
LPiD (5%)	9,77 ± 1,28 *
LPiA (5%)	17,78 ± 1,79 *
LPiM (5%)	7,63 ± 0,79 *
LPiM (1%)	14,98 ± 0,56 *

* $P < 0,05$ comparado ao grupo controle tratado com carragenina e emulgel base (ANOVA seguido do teste *Dunnnett*). Extratos e frações foram testados a 5% e 1% (p/p). Os valores representam a média ± e.p.m. em %. As medidas foram realizadas antes e 3 h depois da administração da carragenina (0,1%) em camundongos.

A via de administração escolhida foi a tópica, pois as arnicas brasileiras são utilizadas de maneira semelhante à arnica européia (*Arnica montana*). Preparações utilizando flores de *Arnica montana* são utilizadas na medicina tradicional para tratamento tópico de doenças inflamatórias e efeitos pós-traumáticos (MERFORT, 2003). A administração tópica representa uma via alternativa da administração oral e intravenosa de ativos medicamentosos e oferece muitas vantagens como ausência de efeito de primeira passagem, liberação contínua da droga, diminuição dos efeitos colaterais e melhor aceitação do paciente (GUY & HADGRAFT, 1985; GWAK & CHUN, 2002).

A base escolhida foi a de emulgel, pois os padrões empregados estavam veiculados nesta formulação, a fim de evitar possíveis interferentes dos veículos na permeação cutânea. Escribano e colaboradores, 2003, realizaram um estudo com amostras de pele humana e diclofenaco e verificaram que diferentes bases promoviam variáveis permeações do fármaco. Emulgéis, preparações relativamente novas, são sistemas óleo-água, contendo uma goma como espessante da fase aquosa externa e podem ser constituídas de uma preparação geleificada na qual se incorpora um agente emulsificante ou um emulsificante em conjunto com uma fase oleosa que pode ser um óleo mineral ou vegetal (MARQUARDT & SUCKER, 1998; GOOGRICH, 1997).

A administração tópica de LPiE na concentração de 5% reduziu significativamente o edema de pata mensurado 3 h após a administração de carragenina, comparado ao grupo controle (emulgel base), sugerindo uma atividade anti-inflamatória desse extrato (Tabela 4.3).

O medicamento comercial empregado (Cataflam) e o formulado neste trabalho apresentaram atividades semelhantes entre si e foram capazes de reduzir significativamente o edema (Tabela 4.3).

As patas sham que receberam o tratamento com os emulgéis contendo o extrato etanólico bruto e as quatro frações não desenvolveram edema de maneira semelhante ao grupo sham tratado com emulgel base. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os sham (dados não mostrados). Essas observações indicam ausência de atividade pró-inflamatória da base, do extrato de *L. pinaster* e de suas frações por via tópica.

Como mostra a Tabela 4.3, todas as frações obtidas do extrato etanólico bruto (LPiH, LPiD, LPiA e LPiM) na concentração de 5% e o LPiM na concentração de 1% foram capazes de reduzir significativamente o volume do edema dos animais tratados em comparação com os animais controle, mas a fração mais ativa foi a LPiM a 5%. Avaliou-se a atividade anti-inflamatória da fração metanólica em 5% e 1% para verificar se o efeito seria semelhante para ambas concentrações ou se diminuiria em uma concentração menor. Os resultados mostram que o efeito anti-inflamatório da formulação contendo 5% da fração metanólica foi similar ao efeito do Cataflam e da formulação com diclofenaco e a atividade anti-inflamatória da fração metanólica a 1% foi semelhante ao extrato etanólico bruto (LPiE). Assim, houve uma redução do efeito anti-inflamatório quando reduziu-se a concentração da fração metanólica.

Os resultados obtidos estão em acordo com Azevedo, 2004, que demonstrou a atividade antiedematogênica da solução hidroalcoólica do extrato de *L. pinaster* administrada

por via oral em camundongos e também com os dados de Guzzo e colaboradores, 2008, que administraram topicamente o extrato de *L. pinaster* e mostraram que este produzia um efeito anti-inflamatório estatisticamente semelhante ao padrão diclofenaco gel. Outros trabalhos com *Lychnophoras* também mostram esta atividade anti-inflamatória, tais como Santos, 2006, que avaliou a eficácia do extrato de *L. ericoides* em edema de pata de ratos *Wistar* induzida por carragenina e comprovou uma significativa redução. E ainda, Contrera e colaboradores, 1985, estudaram a tintura-mãe de raízes de *L. ericoides* em feridas cutâneas de ratos e verificaram que houve retardo na cicatrização das feridas e diminuição do edema nos animais submetidos ao tratamento com a tintura em relação ao controle.

A investigação química do gênero *Lychnophora* proporcionou a descoberta de vários sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, lactonas sesquiterpênicas, esteróides, poliacetilenos, lignanas e flavonóides (SARTORI et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2003). Estudos fitoquímicos da espécie *L. pinaster* levaram ao isolamento de triterpenos, tais como lupeol, uma mistura de α e β -amirina e fridelina, lactonas sesquiterpênicas como 15-desoxigoiazensolido, flavonóides como a quercetina, pinobanksina, vitexina (8-C- β -glicosilapigenina) e isovitexina (6-C- β -glicosilapigenina) e ácidos fenólicos como ácido caféico, ácido isoclorogênico e ácido cinâmico (DUARTE, 1993; OLIVEIRA et al., 1996; DUARTE, 1999; SILVEIRA et al., 2005 e FERREIRA et al., 2005).

A atividade anti-inflamatória, em muitas espécies vegetais, pode ser atribuída à presença triterpenos (AHMAD et al., 1983; SAFAYHI & SAILER, 1997; MENDES, 2004). Diversos estudos realizados com a mistura de α - e β -amirina mostraram a potente atividade anti-inflamatória desses triterpenos (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA, 2005 e OLIVEIRA et al., 2005a). O lupeol administrado por via oral e intraperitoneal demonstrou atividade anti-inflamatória em testes de inflamação aguda e crônica em ratos e camundongos (GEETHA & VARALAKSHMI, 1998). Em modelos de artrite crônica, o lupeol agiu como um potente anti-inflamatório que não possui efeitos ulcerogênicos gástricos, sugerindo que este possui um mecanismo de ação diferente dos AINEs (GEETHA & VARALAKSHMI, 2001).

Flavonóides são compostos fenólicos antioxidantes de vasta distribuição entre as plantas (CALIXTO et al., 2003). 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). Estudos recentes demonstraram que flavonóides extraídos de espécies vegetais da família Asteraceae apresentaram atividade anti-inflamatória *in vivo*

(BUKHARI et al., 2007; MCKAY & BLUMBERG, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005; DELGADO et al., 2001) e *in vitro* (ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA & WIKTOROWICZ, 2006; FRANKE & SCHILCHER, 2005). Flavonóides como a vitexina e a isovitexina possuem atividade anti-inflamatória devido a suas propriedades anti-histamínicas, antibradicnina e antisserotonina (PRABHAKAR et al., 1981). Estes flavonóides demonstraram atividade antioxidante e anti-inflamatória tópica utilizando modelo de edema de orelha (KIM et al., 1998). Sridhar e colaboradores, 2006, mostraram que a vitexina é um potente agente anti-inflamatório por inibir a 5- lipooxigenase. Esta juntamente com a ciclooxigenase-2 são importantes para a produção e manutenção da inflamação.

Conforme relatos da literatura (KIM et al., 1999; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2005; RAO et al., 2005; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007), a quercetina, flavonóide já isolado das espécies *L. passerina* (CHICARO et al., 2004), *L. ericoides* (BORELLA et al., 1998) e *L. pinaster* (SILVEIRA et al., 2005), inibiu a produção de NO e a expressão de iNOS (óxido nítrico sintase induzível) *in vitro* o que também já foi confirmado em estudos *in vivo* (MORALES et al., 2006; SHEN et al., 2002).

Estudos fitoquímicos demonstraram que o gênero *Lychnophora* acumula lactonas sesquiterpênicas. Estas parecem modular muitos processos que influenciam reações inflamatórias, como exemplos, fosforilação oxidativa, agregação plaquetária, liberação de histamina e serotonina (HALL et al., 1980; SCHRÖDER et al., 1990). Essas atividades são mediadas quimicamente por estruturas carbonílicas α,β -insaturadas, que reagem com nucleófilos, especialmente grupos cisteína sulfidrílicos (PICMAN et al., 1979; PICMAN, 1986; SCHMIDT, 1999). O furanoheliangolido 15-desoxigoiazensolido é uma lactona sesquiterpênica isolada de várias espécies da subtribo *Lychnophorinae* (tribo *Vernonieae*, família Asteraceae), e possui um grupo α -metileno- γ -lactona e um grupo carbonila $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -insaturada (SAKAMOTO et al., 2003; CROTTI et al., 2005). A atividade anti-inflamatória das lactonas sesquiterpênicas é principalmente atribuída à inibição do fator de transcrição NF- κ B (LYSS et al., 1997; RÜNGELER et al., 1999; MAZOR et al., 2000; SIEDLE et al., 2004). O NF- κ B é um mediador central na resposta imunológica, pois regula a síntese de interleucinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-2, IL-8 e TNF- α , bem como modula o gene da ciclooxigenase-2, óxido nítrico sintase, imunorreceptores, moléculas de adesão e fatores de crescimento hematopoiético (HALL et al., 1980; SCHRODER et al., 1990; BAEUERLE & HENKEL, 1994; LYB et al., 1998; KARIN & DELHASE, 2000). A inibição dessa proteína

por alquilação seletiva de sua subunidade p65, provavelmente através da reação com resíduos de cisteína, é a chave para a regulação dos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória (RÜNGELER et al., 1999; LYß et al., 1998; GARCIA-PIÑERES et al., 2001).

Os outros componentes químicos presentes em *Lychnophoras* são os ácidos fenólicos tais como o ácido caféico, clorogênico e cinâmico (SANTOS et al., 2005; SILVEIRA et al., 2005). Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, sendo, por isso, indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras enfermidades (KERRY & ABBEY, 1997; BRAVO, 1998; CROFT, 1998; FERGUSON & HARRIS, 1999).

Estes compostos podem funcionar como antioxidantes, sequestrando radicais e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI et al., 1992), agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (NAWAR, 1985). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). Dentre esses radicais estão os de nitrogênio gerados em processos inflamatórios pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) a partir de arginina, oxigênio e NADPH, gerando também NADP⁺ e citrulina (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002; KOLIOS et al., 2004; NUNES et al., 2006). Algumas citações foram encontradas com relação à ação antioxidante dos ácidos fenólicos em sistemas biológicos, e na maioria das vezes foram realizados estudos *in vitro* com estas substâncias (SOARES 2002). Alguns estudos demonstraram que os ácidos cafeoilquínicos, caféico e clorogênico, apresentaram elevado potencial antioxidante utilizando o modelo de peroxidação de células (KIMURA et al., 1984; PULLA REDDY & LOKESH, 1992; OHNISHI et al., 1994; NARDINI et al., 1998) e também apresentaram um elevado poder antioxidante no modelo de oxidação de LDL *in vitro* (LARANJINHA et al., 1994; VINSON et al., 1995; LARANJINHA et al., 1996; VINSON & DABBAGH, 1998). O ácido caféico no ensaio da atividade de 5-lipooxigenase mostrou-se um inibidor do tipo não competitivo e de grande eficácia (SUD'INA et al., 1993; MIRZOEVA & CALDER, 1996). Estes antioxidantes melhoram o

sistema imunológico, ajudam a controlar a resposta inflamatória e fortalecem a defesa antioxidante, que por sua vez, protege as células normais do ataque da inflamação (STRAND, 2004).

Segundo Ferraz Filha, 2008, o extrato etanólico de *L. pinaster* apresentou atividade antioxidante significativa. Esta atividade pode ser atribuída aos flavonóides e ácidos fenólicos presentes no extrato da planta.

Além da atividade antioxidante, os ácidos caféico e clorogênico apresentaram atividade anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina (SANTOS 2006). Dentre as atividades biológicas atribuídas ao ácido clorogênico foi demonstrado que ele é capaz de inibir, embora fracamente, o edema tópico em orelha de ratos induzido por ácido araquidônico (AA) (HUANG et al., 1991). Esta ação baseia-se na inibição do ácido clorogênico sobre o metabolismo *in vitro* do AA em ácido 5- hidroxitetraenóico (5-HETE) e 8-hidroxitetraenóico (8-HETE) (HUANG et al., 1991). Sendo estas duas, moléculas precursoras, respectivamente, de prostaglandinas e tromboxanos.

Estudos prévios com ácidos cafeoilquínicos dissustituídos 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico (GOBBO-NETO et al., 2005; SANTOS, 2006) demonstraram que estes não apresentaram atividade anti-inflamatória no edema de pata. Segundo Santos, 2006, os ácidos monocafeoilquínicos e os dicafeoilquínicos apesar de pertencerem à mesma série de isômeros e conterem as mesmas funções químicas apresentam diferenças estéricas interagindo de forma diferente com as moléculas biológicas (modelo chave-fechadura).

Baseado no que foi exposto, propõe-se que as atividades anti-inflamatórias do extrato etanólico bruto (LPiE) de *Lychnophora pinaster* e de suas frações (LPiH, LPiD, LPiA e LPiM) podem estar atribuídas à presença de terpenóides, flavonóides, saponinas e ácidos fenólicos detectados segundo a Tabela 4.1, pág. 59. Uma possível explicação para a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto (LPiE) ser menos ativo que a fração metanólica (LPiM 5%) pode estar relacionada com a concentração nesta fração das substâncias mais ativas (flavonóides poliidroxilados e saponinas) enquanto que a presença destas substâncias em LPiE ocorre juntamente com muitos outros compostos tais como clorofila, ésteres de ácidos graxos, hidrocarbonetos saturados, terpenóides, ácidos fenólicos e flavonóides menos polares. Assim, o extrato LPiE estaria mais diluído reduzindo sua resposta inflamatória nos seus diferentes eventos (alterações vasculares, migração celular, produção de mediadores e espécies reativas tóxicas que dão continuidade à resposta), explicando esta menor atividade.

Os resultados obtidos justificam o uso do extrato etanólico de *L. pinaster* na medicina popular como agente anti-inflamatório e indicam que a via tópica é adequada para sua utilização.

4.4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto, basicamente, por dois grandes grupos de drogas analgésicas: os opióides, que atuam diretamente na transmissão nociceptiva do sistema nervoso central pela ligação em receptores opióides (HOSKIN & HANKS, 1991; ZADINA et al., 1997), e drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (AINES) que previnem a sensibilização de receptores periféricos e centrais da dor inibindo a ciclooxigenase (CASHMAN, 1996).

Os analgésicos atuais, tais como opióides e as drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, não são adequados a todos os pacientes e em todos os casos. Particularmente é na dor crônica, onde se observa suas limitações, como por exemplo, nos numerosos efeitos colaterais, incluindo propensão à tolerância. Dessa forma, a pesquisa visando à descoberta de outras terapias alternativas se faz necessária. As plantas medicinais são conhecidas por serem importante fonte de novas substâncias químicas com potenciais efeitos terapêuticos. A pesquisa com plantas utilizadas tradicionalmente pela população no alívio de dores desempenha papel estratégico na busca de novas drogas analgésicas (VONGTAU et al., 2004).

Muito do que se sabe sobre os mecanismos da dor derivam de modelos experimentais. Em geral, os testes algésimétricos inflamatórios são baseados na análise de respostas comportamentais desencadeadas diretamente por um processo inflamatório, como os modelos de contorção abdominal e incapacitação articular, ou que são deflagradas indiretamente por um estímulo exógeno primário ou associado ao processo inflamatório como os testes de retirada da pata evocada por pressão ou calor (LAVICH et al., 2005).

Em animais, a resposta nociceptiva pode ser detectada através de uma reação de fuga ao estímulo nocivo. Além disto, manifestações fisiológicas de nocicepção medular ou supramedular podem ser utilizadas na avaliação de possíveis efeitos analgésicos de drogas e seus mecanismos de ação, bem como no entendimento do processo doloroso. Muitos métodos para a avaliação da atividade analgésica em animais foram idealizados. Esses testes envolvem a aplicação de estímulos dolorosos padronizados e a observação da resposta do animal e,

então, verificação da capacidade de uma droga ou procedimento de alterar a intensidade da resposta ao estímulo nocivo. Nestes testes, o estímulo mínimo em intensidade e duração deve ser preferencialmente usado de modo que os animais experimentais não sejam submetidos a sofrimento injustificado ou a traumatismos físicos (ZIMMERMANN, 1983).

A escolha do método mais apropriado para avaliação da resposta nociceptiva é fundamental para a correta interpretação e estudo dos mecanismos envolvidos na transmissão da resposta dolorosa e dos agentes que interferem nestas vias. As características desejáveis de um método de avaliação incluem a reprodutibilidade além de não ser invasivo e permitir a quantificação do fenômeno (LE BARS et al., 2001). A habilidade de medir o limiar termnociceptivo em roedores é uma ferramenta importante na pesquisa da dor, já que é considerada uma indicação direta da condição nociceptiva (GALBRAITH et al., 1993). A utilização de um teste térmico traz algumas vantagens sobre estímulos mecânicos, pelo fato de serem ativados basicamente os nociceptores específicos, enquanto a estimulação mecânica pode ativar também mecanorreceptores de baixo limiar (fibras A β) (LE BARS et al., 2001).

O modelo da placa quente é um dos testes termo-algesimétricos comumente utilizados para investigação de nocicepção e analgesia em roedores. Este método foi originalmente descrito por Woolfe & Macdonald, 1944. Posteriormente, foram propostas adaptações ao teste visando uniformizar e aumentar sua reprodutibilidade (EDDY & LEIMBACH, 1953). Estes autores propuseram que fossem utilizadas temperaturas entre 50 e 55° C, caracterizando melhor a resposta observada. A técnica consiste no registro temporal do início da resposta nociceptiva dos animais colocados sobre uma superfície com temperatura constante. Decorridos alguns segundos o estímulo térmico se torna aversivo e os animais reagem com um padrão consistente de comportamento. As respostas observadas incluem salto, pontapés, sapateio, sacudida da pata, lambida ou até mesmo a contenção da pata junto ao corpo. A observação de um destes comportamentos determina o final do teste. Parte da confiabilidade deste teste reside no fato de que estes comportamentos raramente são manifestados pelo animal na ausência do estímulo térmico (EDDY et al., 1950). Este teste é capaz de detectar e quantificar os efeitos analgésicos de drogas que atuam no sistema opioidérgico e as que previnem a sensibilização de nociceptores, tais como a morfina e AINEs (paracetamol e ácido acetilsalisílico). A temperatura da placa quente em torno de 50° C é suficiente para desencadear resposta nociceptiva sem causar lesões na pata do roedor, quando o teste é bem conduzido (TJØLSEN et al., 1991). Os testes onde a temperatura da placa quente é inferior a

50° C apresentam maior tempo de latência, porém com a desvantagem de aumentar a variabilidade das leituras. (O'CALLAGHAN & HOLTZMAN, 1975; HANDWERKER, 1983; HUNSKAAR et al., 1986).

Os resultados apresentados na Tabela 4.4 mostram o efeito das diferentes doses do extrato etanólico (LPiE) de *L. pinaster*, administrado via oral, sobre o tempo de latência para o camundongo lamber as patas, quando submetido à estimulação térmica no método da placa quente à $56 \pm 1^\circ$ C. A morfina utilizada como padrão-ouro de analgesia no teste da placa quente, aumentou significativamente o tempo de permanência do animal sob o estímulo térmico quando comparada ao controle. Isto ocorreu porque esse método é considerado seletivo para compostos com atividade sobre o SNC (JANSSEN et al., 1963; LE BARS et al., 2001). Em contraste ao efeito da morfina, a indometacina e alguns AINEs não possuem efeito analgésico significativo neste teste (YAMAMOTO & NOZAKI-TAGUCHI, 1996; SANTOS et al., 1998). A dipirona, padrão utilizado no teste da placa quente, aumentou de forma significativa a latência ao estímulo térmico quando analisada neste teste. O mecanismo de ação pelo qual se evidencia o efeito analgésico da dipirona ainda não está claramente elucidado, parece haver mecanismos periféricos e centrais (ANDRADE, 2005). Vazquez e colaboradores, 2005, conseguiram demonstrar que embora a dipirona seja um analgésico não-opiídeo consegue ativar circuitos opioidérgicos endógenos na substância cinzenta periaquedutal e no núcleo magno da rafe (áreas que compõem o sistema descendente inibitório espinhal).

O extrato de *L. pinaster* na dose de 500 mg/kg apresentou atividade antinociceptiva evidenciada pelo aumento no tempo de reação do animal, sendo de $19,86 \pm 3,36$ s. Este efeito foi semelhante ao observado após administração da morfina ($20,63 \pm 3,42$ s). A dose de 750 mg/kg apresentou efeito semelhante à dipirona, sendo $10,19 \pm 1,22$ s e $12,70 \pm 0,92$ s, respectivamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Variação do tempo em que os camundongos gastam para lambe a (s) pata (s) comparando-se diferentes doses do extrato etanólico bruto e padrões com o controle.

Tratamento Oral	Variação do tempo de latência para lambe a pata (s)
Controle	0,81 ± 0,19
Morfina 10mg/kg	20,63 ± 3,42*
Dipirona 200 mg/kg	12,70 ± 0,92*
Indometacina 10 mg/kg	4,66 ± 0,22
LPiE 125 mg/kg	5,39 ± 0,31
LPiE 250 mg/kg	5,03 ± 0,46
LPiE 500 mg/kg	19,86 ± 3,36*
LPiE 750 mg/kg	10,19 ± 1,22*

* $P < 0,05$ aumento da variação da resposta nociceptiva comparada ao grupo controle (ANOVA seguido do teste *Dunnnett*). Os valores representam a média ± e.p.m. O tempo para que os animais apresentassem o reflexo de lambe as patas (tempo de latência para a resposta nociceptiva) foi registrado antes e 30 minutos (min) após administração das soluções do extrato etanólico bruto de *Lychnophora pinaster* em diferentes doses (125; 250; 500 ou 750 mg/kg), das soluções padrão (morfina, dipirona ou indometacina) ou da solução controle.

O teste da placa quente caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente a centros corticais, sendo que a resposta é proporcional à frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem (DICKENSON & BESSON, 1997). Estas fibras são estimuladas após a ativação dos receptores vanilídeos, entre eles, especificamente o tipo VR-1 (limiar de ativação = 43° C) e VRL-1 (limiar de ativação = 52° C), que são responsáveis pela resposta ao aumento da temperatura, sendo que os receptores VRL-1 são mais importantes na medição da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS & BASBAUM, 2001). Estudos recentes demonstraram que há um aumento da expressão do VRL-1 em tecidos obtidos de pacientes afetados com condições patológicas como doenças inflamatórias, hiperalgesia e carcinoma (CALIXTO et al., 2005).

O resultado positivo no teste da placa quente sugere uma importante participação de mecanismos supra-espinhais (YASKSH & RUDY, 1977) na mediação da atividade antinociceptiva demonstrada pelo extrato etanólico bruto de *L. pinaster*.

Para ter certeza de que a atividade antinociceptiva do extrato ocorre em nível central são necessários estudos de nocicepção induzido pela capsaicina e glutamato administrados na pata de camundongos. A capsaicina (8-metil-N-vanillil- 6-nonenamida) é uma substância álgica obtida da pimenta vermelha, “*chilli pepper*”, disponível como ferramenta

farmacológica para o estudo dos subtipos de fibras sensoriais primárias do tipo C e A δ , incluindo os nociceptores polimodais e termocetores (HOLZER, 1991; CATERINA & JULIUS, 2001). A nocicepção induzida pela capsaicina é mediada principalmente pela ativação do receptor vanilóide (VRL-1) (SZALLASI & BLUMBERG, 1993; CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998) promovendo a entrada de cátions e causando estimulação nociceptiva direta das fibras aferentes primárias. Além disso, a ativação do VRL-1 provoca a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e mediadores inflamatórios, os quais contribuem para a sensibilização e ativação das fibras aferentes nociceptivas (SZALLASI & BLUMBERG, 1993; SANTOS & CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 2003).

O glutamato é um dos neurotransmissores mais importantes envolvidos na estimulação nociceptiva, tanto na periferia quanto no SNC (MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). Além disso, tem sido relatado que o glutamato estimula a liberação de aminoácidos excitatórios, prostaglandinas, óxido nítrico, cininas (BEIRITH et al., 2002; SAKURADA et al., 2003), substância P (SP), fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e prótons no corno dorsal da medula espinhal (MILLAN, 1999). Os prótons poderiam interagir com receptores VRL-1 e assim propagar a transmissão do sinal nociceptivo (JULIUS & BASBAUM, 2001). Segundo Beirith e colaboradores, 2002, a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato parece envolver locais de ação espinhal e supra-espinhal e esses efeitos podem ser mediados por diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos.

Os resultados observados neste trabalho em relação à atividade antinociceptiva avaliada pelo método da placa quente estão de acordo com os resultados encontrados nos estudos de Guzzo e colaboradores, 2008, para a espécie *L. pinaster*, realizados a partir deste mesmo método. Outros pesquisadores como Cerqueira e colaboradores, 1987, verificaram a ação analgésica do extrato do caule e folhas de *L. ericoides* através do teste da placa quente. A dipirona e a morfina foram usadas como padrões para avaliar a potência da arnica em relação às drogas analgésicas já conhecidas. Neste estudo verificou-se, em cada tempo, que os animais tratados com arnica nas maiores doses reagiram ao estímulo térmico de maneira semelhante àqueles tratados com morfina e a dipirona.

Segundo Azevedo, 2004, a administração do extrato bruto hidroalcoólico de *L. pinaster* produziu um efeito antinociceptivo em camundongos, mas este efeito não foi revertido pela administração prévia de naltrexona (antagonista não seletivo dos receptores

opioides; derivado da naloxona, mais potente e de longa duração) (GOZZANI, 1994), sugerindo que mecanismos opioides não estejam envolvidos na antinocicepção desse extrato. Mas esta reversão não garante que o extrato etanólico de *L. pinaster* não possa ativar os mecanismos opioides tal como a dipirona anteriormente citada por conseguir ativar circuitos opioidérgicos.

A ação antinociceptiva de *Lychnophoras* está relacionada à presença de flavonóides, triterpenos, lactonas sesquiterpênicas (BORELLA et al., 1998) e ácidos caféicos (SANTOS et al., 2005).

Jordão e colaboradores, 2004, observaram que a quercetina possui efeito antinociceptivo estudando *L. salicifolia* Mart. Quercetina e vitexina, flavonóides isolados no extrato de *L. pinaster* por HPLC (OLIVEIRA et al., 1996; SILVEIRA et al., 2005), também apresentaram atividade antinociceptiva no teste da placa quente (RYLSKI et al., 1979). A quercetina é uma substância cujo efeito antinociceptivo parece ocorrer através do envolvimento dos receptores D₂ de dopamina e alfa₂-adrenoreceptores (NAIDU et al., 2003; KAUR et al., 2005).

Vários triterpenóides se mostraram promissores agentes analgésicos em estudos experimentais e clínicos (CALIXTO et al., 2000a; ALMEIDA et al., 2001; TAKAYAMA et al., 2002). Oliveira e colaboradores, 2005a, mostraram que os triterpenos α - e β -amirina exerceram efeito antinociceptivo no modelo de nocicepção induzida pela injeção sub-plantar de capsaicina sem causar déficits neurológicos ou musculares. Otuki e colaboradores, 2005, demonstraram que a mistura dos triterpenos α - e β -amirina apresentam atividade antinociceptiva pelo método de contorções induzida por ácido acético. Esses triterpenos já foram isolados nas espécies *L. ericoides* (SAKAMOTO et al., 2003), *L. candelabrum* (SANTOS et al., 2004), *L. pinaster* (SILVEIRA et al., 2005) e *L. trichocarpha* (SAÚDE et al., 1998).

Outros constituintes como os ácidos fenólicos estão presentes no gênero *Lychnophora* (SANTOS et al., 2005; SILVEIRA et al., 2005). Segundo Santos, 2006, o ácido clorogênico apresentou atividade antinociceptiva no modelo de dor induzida pela formalina.

O extrato etanólico de *L. pinaster* apresentou atividade antinociceptiva mais significativa na dose de 500 mg/kg do que na dose de 750 mg/kg (Tabela 4.4). Este resultado parece conflitante, mas, no entanto pode ser explicado se considerarmos que o extrato etanólico bruto de uma planta é constituído por uma mistura complexa de substâncias com

atividades biológicas distintas, entre as quais substâncias potencialmente irritantes para os tecidos. Muitas dessas substâncias como sais minerais, saponinas e até mesmo a clorofila em altas concentrações poderiam ocasionar ou potencializar uma resposta hiperalgésica. Esta resposta hiperalgésica resultante da interação sinérgica entre bradicinina, serotonina e histamina (LAVICH et al., 2003) parece mascarar a atividade antinociceptiva do extrato LPiE na dose de 750 mg/kg. Assim, o aumento da dose de LPiE poderia ocasionar uma administração de quantidades maiores das substâncias irritantes que produziriam um efeito antagônico à atividade antinociceptiva em estudo. Outra explicação para este fato seria a dose-resposta bifásica ou também conhecida como hormese. O termo hormese é um fenômeno biológico definido por uma resposta estimulatória a baixas doses de um agente químico ou fator ambiental e uma resposta inibitória deste mesmo agente em doses maiores (CALABRESE & BALDWIN, 2002). Portanto, este estudo indica que a atividade analgésica do extrato etanólico de *L. pinaster* se comporta de maneira bifásica, sendo que a dose de 500 mg/kg causou um efeito antinociceptivo maior do que na dose de 750 mg/kg.

Os resultados mostraram atividade antinociceptiva relevante para o extrato etanólico de *L. pinaster* na dose de 500 mg/kg, o que sustenta o uso da espécie na medicina popular como analgésica e mostra que a espécie em estudo pode apresentar potenciais substâncias ativas que podem tornar-se fármacos para o tratamento da dor.

4.4.3. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

As avaliações de toxicidade são parte integrante e indispensável ao desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Há muito tempo as plantas vêm sendo utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de várias enfermidades. No entanto, somente agora houve a preocupação em ter o conhecimento científico das propriedades farmacológico-terapêuticas e da possível toxicidade que os constituintes químicos destas plantas possam apresentar (REBECCA et al., 2002).

Considerando que a toxicidade de uma substância a um organismo vivo seja a capacidade de lhe causar dano grave ou morte, e que para este dano ocorrer deve haver uma relação entre concentração e tempo de exposição (BARROS & DAVINO, 2003), é real a preocupação no que se refere ao uso de plantas para fins medicinais. Assim, são necessários critérios na sua utilização para que seus benefícios sejam maiores que os riscos (SILVA et al., 2002a). Frente a essas questões, a incorporação dos recursos da medicina popular na medicina

científica requer a avaliação de sua segurança e eficácia através de análises de toxicidades aguda ou crônica (SCHENKEL et al., 1985).

Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Fundação Oswaldo Cruz, 2003, mostraram que dos 2616 casos de intoxicação por plantas registradas no Brasil em humanos e animais, 1955 (74,7%) foram em humanos e dos nove registros de óbitos em humanos e animais, 55,5% foram em humanos. No estado de São Paulo, foram relatados 411 casos de intoxicação em humanos e dos três óbitos registrados, 1% foi devido ao uso de plantas.

A espécie vegetal *L. pinaster* é utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, para tratamento de traumatismos, reumatismos, contusões e picadas de insetos (RODRIGUES et al., 2001). No entanto, somente um estudo que avalie suas propriedades tóxicas *in vivo* foi realizado (AZEVEDO, 2004).

Realizando um levantamento da toxicidade *in vivo* para as *Lychnophoras*, encontramos alguns estudos sobre este assunto. Dois destes avaliavam a atividade locomotora espontânea de *L. ericoides* e de *L. trichocarpha* (CERQUEIRA et al., 1987; GUZZO, 2007). Nestes estudos, os autores verificaram redução da atividade locomotora espontânea em camundongos após a administração do extrato hidroalcoólico das duas espécies. Outro estudo realizado em nosso laboratório mostrou que o extrato bruto de *L. trichocarpha* administrado intraperitonealmente foi tóxico para camundongos (FERRARI, 2008).

Estudos que avaliavam a toxicidade *in vitro* também foram encontrados, tais como o estudo de Santos e colaboradores, 2004a, e Ferraz-Filha, 2008. Segundo Santos e colaboradores, 2004a, o extrato etanólico de *L. ericoides* e as lactonas sesquiterpênicas isoladas deste foram citotóxicos para diversas linhagens celulares. Já no estudo de Ferraz-Filha, 2008, os extratos de seis espécies de *Lychnophoras* foram submetidos a testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina*. Neste estudo verificou-se que o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* apresentou $DL_{50} = 678,732 \mu\text{g/mL}$, sendo que concentrações menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$ são consideradas citotóxicas.

Embora os resultados dos testes que avaliem a citotoxicidade *in vitro* possam não ter uma correlação direta com os *in vivo*, pode-se especular que, se um material induz, comprovadamente, uma reação citotóxica em testes envolvendo cultura de células, é muito provável que desenvolva toxicidade quando aplicado em tecido vivo (OSORIO et al., 1998).

Então para comprovar a correlação da citotoxicidade *in vitro* com a toxicidade *in vivo* foi avaliada a toxicidade aguda da espécie *L. pinaster* em camundongos.

4.4.3.1. ATIVIDADE LOCOMOTORA E FORÇA MUSCULAR

Uma grande preocupação nos experimentos designados para avaliar atividade antinociceptiva de novas substâncias é se o tratamento farmacológico causa outras alterações no comportamento, tais como, prejuízo motor ou sedação, o que poderia mascarar o efeito antinociceptivo (TABARELLI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005a) do extrato a ser testado.

Assim testes que detectam déficits neurológicos tais como sedação, depressão do SNC (teste de campo aberto) e testes que detectam relaxamento muscular e incoordenação motora (teste da barra giratória, método de tração) são importantes para verificar se as substâncias testadas causam efeitos inespecíficos (PU et al., 1995; NOVAS et al., 1988). A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do estresse e do conflito provocado por este ambiente (MONTGOMERY, 1955). Dados na literatura demonstraram que a redução na atividade locomotora espontânea dá uma indicação do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (MANSUR et al., 1971), e, esta redução pode estar relacionada com a sedação resultante da depressão deste sistema (OZTURK et al., 1996; PEREZ et al., 1998). O teste da barra giratória consiste em colocar camundongos sobre uma barra que gira a uma velocidade constante e verificar a capacidade do animal de equilibrar-se sobre a mesma. Nesse caso, quanto mais intenso for o efeito, menor será o tempo em que o animal consegue se equilibrar sobre a barra. Ressalta-se, no entanto, que se trata de um método não-específico, uma vez que mede indistintamente, efeitos neurológicos, estimulantes e depressores sobre a coordenação motora, aos quais também é atribuído o termo neurotoxicidade (DALLMEIER & CARLINI, 1981).

O teste de campo aberto foi inicialmente descrito por Hall, 1941, como uma arena circular para testar os efeitos do ambiente não familiar sobre as emoções em ratos. Essa medida tinha como parâmetros as taxas de ambulação e de defecação do animal durante o seu desempenho no teste. A avaliação na arena consiste na mensuração dos comportamentos iniciados pela colocação do sujeito experimental em um novo espaço aberto do qual a fuga é prevenida por uma parede circundante. O desencadeamento desses comportamentos é dependente da interação do animal com uma variedade de fatores tais como: remoção do animal de um ambiente familiar, exposição a um ambiente novo, injeção de drogas, lesões

neurais, alterações relacionadas à emoção, além da habituação e do aprendizado (SACHS, 1988). A adoção desse tipo de teste apresenta uma clara conveniência pela facilidade de registro comportamental, quando comparado ao estudo no ambiente natural. Esses estudos demonstram que, durante o confinamento em um novo ambiente, no intuito de explorá-lo, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador do comportamento exploratório (BERNTSON et al., 1988). A aferição desses tipos de respostas é bastante simples, sendo necessário apenas o registro do número de vezes que os comportamentos ocorreram e o seu tempo de duração.

A análise dos efeitos do extrato etanólico de *L. pinaster* sobre o SNC é importante para predizer se o uso desta espécie é seguro para a população, já que os efeitos colaterais sobre o SNC, tais como diminuição do fluxo sanguíneo e o metabolismo cerebral (GOZZANI, 1994), na maioria das vezes não são desejáveis. Com o objetivo de avaliar as atividades da espécie *L. pinaster* sobre o SNC foram utilizados os métodos de campo aberto e de tração.

O método de campo aberto é usado como um mecanismo de avaliação dos efeitos sedativos, tóxicos e estimulantes de substâncias (GOULD et al., 2009).

O aumento da locomoção pode ser considerado um efeito estimulante enquanto a diminuição da atividade locomotora está relacionada à sedação ou prostração (PRUT & BELZUNG, 2003).

No presente estudo, a administração única por via oral do extrato etanólico nas doses de 250 ou 500 mg/kg reduziram significativamente a locomoção espontânea dos animais no método de campo aberto após 24 h da administração quando comparado ao grupo controle (Tabela 4.5). Isso implica que o extrato causou sedação. Entretanto, todos os animais tratados, inclusive aqueles que receberam apenas o veículo (grupo controle), apresentaram redução da locomoção em relação ao tempo zero (testes realizados antes da administração das soluções) e após 4 h. Essa redução da atividade locomotora para todos os grupos (incluindo o controle) se dá, pois, em testes repetidos, os animais rapidamente se acostumam ao campo aberto e a locomoção deles tende a diminuir nos testes seguintes até que a atividade locomotora alcance uma estabilidade passando a não ocorrer mais modificações no comportamento (WALSH & CUMMINS, 1976), mascarando o efeito tóxico do extrato.

Tabela 4.5 - Efeito do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* sobre o número de quadrados percorridos pelos animais em 5 min no campo aberto.

Tempo	n	Controle	Doses (mg/kg)		
			125	250	500
0 hora	28	88,18 ± 9,43	81,93 ± 5,50	88,82 ± 5,78	92,18 ± 5,32
1 hora	28	81,57 ± 9,04	70,75 ± 5,18	87,14 ± 5,28	83,18 ± 6,07
4 horas	28	73,89 ± 9,98*	69,00 ± 4,64*	69,25 ± 5,57*	76,50 ± 5,76*
24 horas	28	94,39 ± 12,86	76,43 ± 6,80	69,71 ± 5,81*	72,64 ± 6,62*
7 dias	28	100,50 ± 10,23	91,95 ± 6,24	101,60 ± 9,11	97,15 ± 7,08
14 dias	14	103,10 ± 13,63	89,57 ± 9,67	97,07 ± 14,29	94,57 ± 9,77

Os valores representam a média ± e.p.m.,

* $P \leq 0,05$ comparado ao tempo controle (Teste t), n = número de animais utilizados no experimento.

O número de vezes que o animal se apóia apenas sobre as patas posteriores em 5 min também foi avaliado no campo aberto e reflete a capacidade exploratória do animal. Os dados apresentados na Tabela 4.6 mostram que o extrato nas doses de 125, 250 ou 500 mg/kg após administração não causaram inibição significativa da capacidade exploratória dos animais tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao tempo zero. Segundo Prut & Belzung, 2003, a diminuição da locomoção é mais sensível que a diminuição da capacidade exploratória principalmente em baixas doses.

Foram utilizados 14 animais (8 machos e 6 fêmeas) no método de campo aberto e de tração nos tempos de 0h, 1h, 4h, 24h e 7 dias para o procedimento de 7 dias. Também foram utilizados 14 animais nos tempos de 0h, 1h, 4h, 24h, 7 dias e 14 dias para o procedimento de 14 dias. Assim, o n de 28 animais corresponde à somatória dos dois procedimentos em tempos iguais, enquanto que o n de 14 animais representa apenas o tempo de 14 dias deste procedimento.

Tabela 4.6 - Efeito do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* sobre o número de vezes que os animais se apóiam apenas sobre as patas posteriores durante 5 min no campo aberto.

Tempo	n	Controle	Doses (mg/kg)		
			125	250	500
0 hora	28	17,11 ± 2,19	19,96 ± 2,15	22,46 ± 2,08	21,07 ± 2,15
1 hora	28	16,11 ± 2,61	15,57 ± 2,07	19,93 ± 2,36	20,29 ± 2,52
4 horas	28	14,86 ± 2,04	19,36 ± 2,35	19,50 ± 2,41	24,50 ± 2,83
24 horas	28	24,75 ± 3,43	25,18 ± 2,94	21,64 ± 2,56	23,04 ± 2,88
7 dias	28	22,21 ± 3,37	26,17 ± 2,58	28,64 ± 2,70	24,64 ± 2,44
14 dias	14	24,07 ± 4,00	28,00 ± 3,68	24,86 ± 4,08	23,14 ± 4,18

Os valores representam a média ± e.p.m.

O método de tração foi utilizado para investigar alterações no tônus muscular dos animais causadas pela administração do extrato de *L. pinaster*. Neste teste as doses administradas não produziram alterações no tônus muscular, sendo que a porcentagem de animais que falharam foi estatisticamente similar entre ambos os grupos, controle e tratados com diferentes doses *L. pinaster*. Os dados estão apresentados na Tabela 4.7. Estes resultados estão de acordo com Azevedo, 2004, que demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *L. pinaster* administrado por via oral, não alterava a permanência dos animais na barra giratória mostrando que não houve alterações motoras.

Tabela 4.7 - Efeito do extrato etanólico de *L. pinaster* sobre a força muscular dos animais pelo método de tração.

Tempo	n	Controle	Doses (mg/kg)		
			125	250	500
0 hora	28	3,57	0,00	10,71	0,00
1 hora	28	7,14	21,43	14,29	14,29
4 horas	28	0,00	14,29	14,29	28,57
24 horas	28	3,57	10,71	10,71	14,29
7 dias	28	3,57	7,14	14,29	10,71
14 dias	14	0,00	7,14	0,00	21,43

Os dados representam a porcentagem de animais que falharam no teste. * $P \leq 0,05$ comparado ao grupo controle (teste exato de Fisher), n = número de animais utilizados no experimento.

A redução da motilidade observada pela redução do número de quadrados percorridos em 5 min no campo aberto ocorreu 4 h após a administração oral das soluções para todos os grupos, inclusive para o grupo controle. No entanto, 24 h após a administração a redução significativa da motilidade foi observada para os grupos que receberam 250 ou 500 mg/kg do extrato e, embora não tenha sido observado alterações sobre o número de vezes que os animais se apoiavam apenas sobre as patas posteriores (rearing), indica sua toxicidade para doses maiores por via oral. Por outro lado esta redução da motilidade pode ser desejável. Segundo Rodríguez e colaboradores, 1984, uma diminuição da atividade locomotora indica um efeito sedativo e pode ser útil como parâmetro de avaliação de ansiedade nos animais. Como não houve redução da força muscular observada na barra de tração indica que a ação periférica não interferiu na redução da motilidade no campo aberto.

4.4.3.2. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Os exames bioquímicos realizados com amostras de plasma e soro sanguíneos são importantes ferramentas para o auxílio no diagnóstico de diversas enfermidades (DORETTO, 1996; KANEKO et al., 1997). Os parâmetros de bioquímica clínica funcionam como indicadores dos processos adaptativos do organismo, no metabolismo energético, protéico e mineral, além de oferecer indicativos na interpretação do funcionamento hepático, renal, pancreático, ósseo, muscular, cardíaco, do sistema nervoso central e do trato gastrintestinal (GONZÁLEZ & SILVA, 2007).

Níveis séricos de amilase são normalmente utilizados como marcadores bioquímicos de doenças pancreáticas, particularmente pancreatite aguda (AGARWAL et al., 1990; CLAVÉ et al., 1995). Há dois tipos de amilase nos humanos: amilase salivar e pancreática (PIEPER-BIGELOW et al., 1990). Há limitações no uso de amilase sérica no diagnóstico de pancreatite (VISSERS et al., 1999) pois existem doenças intra-abdominais não pancreáticas que estão associadas com a elevação dos níveis de amilase, tais como: perfuração de úlcera péptica, doenças biliares, obstrução intestinal, entre outras (RANSON, 1997; VISSERS et al., 1999). Os resultados das dosagens de amilase estão apresentados na Tabela 4.8.

A regulação dos líquidos e eletrólitos e a eliminação dos resíduos metabólicos são essenciais a homeostase corpórea. O sistema renal exerce papel fundamental na realização destas funções. A avaliação dos níveis de uréia e creatinina são os testes mais comumente utilizados na rotina (MOTTA, 2003). Para avaliar a toxicidade renal de LPiE foram mensurados os níveis de uréia, ácido úrico e creatinina no sangue (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Parâmetros bioquímicos de camundongos *Swiss* tratados com extrato etanólico bruto de *L. pinaster* por via oral em dose única.

Grupo		Uréia (mg/dl)	Ácido úrico (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Amilase (mg/dl)	AST/TGO (U/L)	ALT/TGP (U/L)	Fosfatase alcalina (U/L)	Proteínas totais (g/dl)
Controle	D ₇	62,17 ± 1,72	2,10 ± 0,20	0,40 ± 0,04	839,40 ± 29,26	112,60 ± 10,79	57,75 ± 9,54	124,30 ± 9,99	5,49 ± 0,08
	D ₁₄	60,36 ± 2,16	1,47 ± 0,13	0,41 ± 0,06	739,20 ± 21,74	110,10 ± 11,87	54,18 ± 5,07	163,20 ± 14,87	5,65 ± 0,32
125 mg/kg	D ₇	57,14 ± 2,38	2,96 ± 0,37	0,42 ± 0,03	767,20 ± 32,57	78,28 ± 8,69 *	36,19 ± 3,72 *	118,50 ± 7,63	5,53 ± 0,40
	D ₁₄	52,00 ± 2,15	1,71 ± 0,20	0,44 ± 0,04	739,70 ± 27,19	111,00 ± 10,77	61,98 ± 8,81	165,90 ± 11,55	5,26 ± 0,18
250 mg/kg	D ₇	56,55 ± 2,61	2,33 ± 0,19	0,44 ± 0,08	826,20 ± 21,77	80,27 ± 7,69 *	35,67 ± 4,99 *	121,00 ± 5,28	5,29 ± 0,13
	D ₁₄	52,85 ± 2,74	1,56 ± 0,17	0,37 ± 0,03	770,20 ± 28,79	91,43 ± 4,63	30,52 ± 2,16 *	142,50 ± 8,34	5,30 ± 0,16
500 mg/kg	D ₇	62,08 ± 3,12	2,10 ± 0,23	0,39 ± 0,04	831,90 ± 22,60	81,93 ± 7,19 *	26,01 ± 4,02**	132,40 ± 11,04	5,34 ± 0,16
	D ₁₄	59,57 ± 3,78	1,45 ± 0,14	0,40 ± 0,03	767,40 ± 34,32	96,25 ± 4,65	47,74 ± 5,16	142,20 ± 8,52	5,43 ± 0,12

Os valores representam a média ± e.p.m., n = 14 animais (ANOVA seguido do teste de *Dunnnett*, com diferença significativa quando * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). AST/TGO: Aspartato - aminotransferase; ALT/TGP: Alanina – aminotransferase. D₇: após 7 dias da administração do extrato; D₁₄: após 14 dias da administração do extrato.

A uréia é o principal produto do catabolismo das proteínas e aminoácidos, é solúvel em água e é excretada na urina através da filtração glomerular (BRODY, 1999). É responsável por 80% do nitrogênio não-protéico excretado na urina em condições normais (LIMA et al., 2001). As mudanças nas concentrações da uréia no sangue podem ocorrer devido à dieta, às alterações no fígado e nas funções renais e à mudança na taxa do catabolismo de proteínas (FINCO, 1997).

O ácido úrico nos animais é formado pelo metabolismo das bases purínicas, sendo a guanina e adenina convertidas em xantina e hipoxantina, respectivamente. Estas, por ação da xantina oxidase, resultarão em ácido úrico. Alterações nos processos de eliminação do ácido úrico geram diversas desordens tais como: gota, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, esclerose múltipla. A concentração sérica de ácido úrico serve como um importante parâmetro fisiológico/patológico (DAI et al., 2005).

A creatinina é uma substância nitrogenada não protéica. Tecidos musculares contêm fosfocreatina que sofre ciclização espontânea formando creatinina (FINCO, 1997). A creatinina é excretada pela filtração glomerular e qualquer anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário irá resultar na elevação de sua concentração sérica (COLES, 1984).

Os testes de função hepática são importantes na triagem de anormalidades, identificação do tipo e local da lesão e também no prognóstico e acompanhamento de pacientes com doença hepática. Os testes de rotina incluem as dosagens de AST, ALT, fosfatase alcalina e proteínas totais (MOTTA, 2003). Os resultados das dosagens estão na Tabela 4.8.

As alterações hepáticas mais comuns nos níveis enzimáticos podem ser divididas em dois grupos principais: aquelas de predominância hepatocelular e as de predominância colestática. No primeiro grupo encontram-se as enzimas AST e ALT e no segundo grupo a fosfatase alcalina (GIANNINI et al., 2005).

Fosfatase alcalina é amplamente distribuída nos tecidos humanos. A forma predominante na circulação é a de origem hepática e óssea (ZHU & JIANG, 2007). No fígado, localiza-se nas membranas de revestimento dos canalículos biliares, tendo seus níveis elevados em desordens do trato biliar (MOTTA, 2003).

As aminotransferases (AST e ALT) são enzimas intracelulares que catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o α -cetoglutarato, formando

cetoácido e ácido glutâmico, atuando na síntese e degradação de aminoácidos (MOTTA, 2003).

O plasma contém uma mistura de proteínas: albumina e globulinas. A maioria é sintetizada pelo fígado a partir de aminoácidos (PEREZ et al., 2005). O número de proteínas distintas dentro de uma célula humana é estimado entre 3.000 a 5.000. Mais de 300 proteínas diferentes foram identificadas somente no plasma sanguíneo. Muitas delas apresentam funções bioquímicas específicas e suas concentrações podem ser afetadas por processos patológicos sendo investigadas em várias doenças (MOTTA, 2003). As proteínas plasmáticas totais podem estar aumentadas nas desidratações e diminuídas nas desnutrições, insuficiências hepáticas e renais e pelo aumento da perda urinária (PEREZ et al., 2005).

O tratamento agudo com o extrato etanólico (LPiE) em camundongos, via oral, de forma geral, não induziu modificações significativas no perfil bioquímico quando comparado aos grupos controles (Tabela 4.8). Todos os parâmetros mantiveram-se dentro da faixa de referência da literatura com exceção da uréia e fosfatase alcalina. Isto ocorreu porque os testes bioquímicos são específicos para cada método e para cada equipamento. Dessa forma, utilizamos nossos próprios valores de normalidade comparando os resultados dos animais tratados com os controles, pois os testes que dizem respeito à atividade enzimática são os que apresentam maior variação de resultados entre as metodologias utilizadas (LUMSDEN & JACOBS, 1989).

As análises estatísticas foram realizadas inicialmente com os grupos de machos e de fêmeas separadamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os sexos em relação aos parâmetros bioquímicos. Assim, os resultados das dosagens bioquímicas são referentes a um grupo experimental de machos e fêmeas para cada dose avaliada.

Nossos resultados indicaram uma redução significativa da atividade da AST e ALT após 7 dias da administração do extrato nas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg ou 500 mg/kg e uma redução da ALT após 14 dias da administração do extrato apenas na dose intermediária (250 mg/kg). A redução da atividade da ALT é importante na prevenção de danos hepáticos. Isto porque a ALT é um marcador mais específico de dano hepático, pois ocorre em maior quantidade no fígado enquanto a AST é também encontrada no coração, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas e células vermelhas (FILIPPIN et al., 2004). No fígado, a ALT está localizada unicamente no citoplasma, enquanto AST é tanto citosólica (20% da atividade total) quanto mitocondrial (80% da atividade total) (KEW, 2000).

Não foram evidenciadas alterações sugestivas de disfunção pancreática endócrina após a exposição aguda de diferentes doses do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, pois as dosagens de amilase ficaram dentro dos parâmetros de normalidade.

Na avaliação da nefrotoxicidade do extrato de *L. pinaster*, constatou-se que o equilíbrio hidro-eletrolítico (como a excreção de compostos nitrogenados) não foi alterado. Não houve diferenças estatísticas após os tratamentos com dose única (toxicidade aguda) dos níveis de ácido úrico, uréia e creatinina. Todas as dosagens ficaram dentro de nossos próprios valores de normalidade (controles). Entretanto, isso não descarta a nefrotoxicidade do extrato, pois elevações dos níveis de creatinina e uréia somente ocorrem após uma perda significativa dos néfrons funcionais (KATAYAMA & McANULTY, 2002) Somente com outros parâmetros tais como a determinação do peso úmido e a histopatologia dos rins é que se pode comprovar a nefrotoxicidade do extrato (itens 4.4.3.5, pág. 97 e 4.4.3.6, pág. 99).

As provas de função hepática utilizadas neste estudo procuraram rastrear um possível comprometimento das funções de síntese e metabolização do fígado assim como a presença de enzimas associadas à lesão tecidual. Os resultados acerca dos níveis de proteínas totais indicam que não houve prejuízo da função hepática de síntese. As atividades séricas da fosfatase alcalina indicam que a metabolização hepática não foi comprometida pela administração aguda do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*. Os resultados da fosfatase alcalina indicam que não houve colestase (obstrução do fluxo biliar) (DUFOR et al., 2000). As atividades séricas das aminotransferases (AST e ALT) ficaram dentro dos parâmetros de normalidade. Segundo Jmelnitzky e colaboradores, 2000, a redução da atividade da AST e ALT após 7 dias da administração do extrato possui uma causa indeterminada, pois ambas as enzimas estão abaixo do nível de referência. No entanto, ausência de valores de ALT que sejam sugestivos de doença hepática não garante a ausência clínica da doença, por exemplo, nos estágios avançados da doença hepática crônica. Nessa doença os valores de ALT não estão correlacionados com a intensidade da doença hepática observada na biópsia do fígado (KALLAI et al., 1964). Na literatura existem outras doenças hepáticas crônicas como a hepatite viral crônica do tipo C que apresenta valores séricos normais de ALT (ALBERTI et al., 1992; VAN THIEL et al., 1995). Em outro problema como na insuficiência renal, os valores séricos da AST e ALT apresentaram-se significativamente reduzidos quando comparados a indivíduos saudáveis devido à diminuição da piridoxal-5'-fosfato livre (ALLMAN et al., 1992). A AST e a ALT são mensuradas por suas atividades catalíticas

(BERGMEYER et al., 1978); ambas requerem a piridoxal-5'-fosfato para sua máxima atividade, embora o efeito da deficiência da piridoxal seja maior na atividade da ALT do que na AST (VANDERLINDE, 1986; DUFOUR et al., 2000). Além disso, a atividade da ALT foi 20% menor em indivíduos que praticavam exercícios físicos usualmente, sendo este efeito maior nos homens que nas mulheres (KAPLAN, 2002). Assim, somente com avaliação da histopatologia do fígado é que se pode comprovar a hepatotoxicidade do extrato (item 4.4.3.6, pág. 99).

4.4.3.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A avaliação hematológica fornece importantes indícios de manifestações tóxicas locais e sistêmicas induzidas por fármacos. Alterações no número de células circulantes podem indicar o comprometimento da hematopoiese devido a interferências na multiplicação, maturação ou diferenciação celular, processos estes dependentes das células pluripotentes da medula óssea, do microambiente medular e dos fatores reguladores envolvidos. O tempo de instalação e a reversibilidade ou não das lesões, também sugerem os prováveis mecanismos de injúria desencadeados (WYLLIE & WYLLIE, 1991; WEISS, 1993; PISONI et al., 2001).

O hemograma contempla a determinação de diversos parâmetros, com a finalidade de avaliar quantitativa e qualitativamente os componentes celulares do sangue (REBAR & FELDMAN, 2003). Os itens avaliados incluem: contagem de hemácias, hematócrito, determinação da concentração de hemoglobina, índices hematimétricos, leucócitos totais, contagem diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e exame microscópico de esfregaço de sangue corado (MILLER & GONÇALVES, 1995).

A avaliação eritrocitária pode identificar processos anêmicos, policitêmicos, alterações de forma e tamanho das hemácias (REBAR & FELDMAN, 2003).

A contagem diferencial de leucócitos do sangue (eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos e neutrófilos) é um instrumento importante em análises patológicas, pois por meio desta é possível constatar processos inflamatórios, infecciosos, alérgicos, parasitários e leucêmicos (COLES, 1984).

As análises estatísticas foram realizadas inicialmente com os grupos de machos e de fêmeas separadamente. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre os sexos em relação aos parâmetros hematológicos. Assim, os resultados da avaliação hematológica são referentes a um grupo experimental de machos e fêmeas para cada dose avaliada.

Não houve alterações na série eritrocitária dos animais tratados com as doses de 125, 250 ou 500 mg/kg do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (oral) em dose única, após 7 e 14 dias da administração (Tabela 4.9). As alterações observadas nas contagens percentuais das células leucocitárias (neutrófilos e linfócitos) na dose de 250 mg/kg após 7 e 14 dias da administração (Tabela 4.9) indicam apenas variações biológicas, sem significado clínico, visto que estes valores encontram-se dentro dos limites de referência descritos na literatura para esta espécie e não se repetiram nas outras doses, descartando qualquer efeito dependente de

dose. Isto sugere ausência de efeitos deletérios do extrato sobre as séries leucocitárias e eritrocitária.

Tabela 4.9 - Efeito da administração oral aguda, em dose única, do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* nos parâmetros hematológicos de camundongos *Swiss*.

Grupo		Global de leucócitos (10 ³ /mm ³)	Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	Hemoglobina (g/dl)	Hematócrito (%)	Plaquetas (10 ³ /mm ³)	VCM (mm ³)
Controle	D ₇	2,82 ± 0,28	8,95 ± 0,23	14,08 ± 0,33	41,77 ± 1,10	1007,00 ± 33,27	46,62 ± 0,33
	D ₁₄	3,36 ± 0,45	9,31 ± 0,10	14,46 ± 0,27	42,94 ± 0,87	1006,00 ± 27,75	46,79 ± 0,37
125 mg/kg	D ₇	3,23 ± 0,22	8,99 ± 0,11	14,00 ± 0,18	41,51 ± 0,54	1009,00 ± 32,70	46,07 ± 0,29
	D ₁₄	4,20 ± 0,63	9,01 ± 0,12	14,36 ± 0,16	42,67 ± 0,41	1081,00 ± 30,42	47,29 ± 0,30
250 mg/kg	D ₇	3,72 ± 0,26	8,89 ± 0,13	13,86 ± 0,33	41,03 ± 0,88	956,00 ± 39,02	46,93 ± 0,32
	D ₁₄	3,77 ± 0,32	9,33 ± 0,09	14,78 ± 0,12	43,92 ± 0,63	1010,00 ± 29,30	47,43 ± 0,58
500 mg/kg	D ₇	3,34 ± 0,36	8,84 ± 0,17	14,00 ± 0,18	41,63 ± 0,66	1119,00 ± 38,04	47,07 ± 0,35
	D ₁₄	3,29 ± 0,37	8,95 ± 0,22	14,20 ± 0,21	42,04 ± 1,01	1086,00 ± 30,59	47,15 ± 0,25

Grupo		HCM (pg)	CHCM (g/dL)	Eosinófilo (%)	Neutrófilo (%)	Linfócito (%)	Monócito (%)
Controle	D ₇	15,75 ± 0,13	33,75 ± 0,20	1,08 ± 0,14	22,69 ± 2,32	73,38 ± 2,30	2,85 ± 0,27
	D ₁₄	15,78 ± 0,09	33,62 ± 0,20	1,31 ± 0,13	16,86 ± 2,35	78,57 ± 2,33	3,25 ± 0,45
125 mg/kg	D ₇	15,60 ± 0,13	33,82 ± 0,26	1,25 ± 0,13	18,07 ± 1,82	77,64 ± 1,73	2,93 ± 0,19
	D ₁₄	15,94 ± 0,09	33,68 ± 0,11	1,31 ± 0,13	12,64 ± 1,42	82,21 ± 1,64	3,88 ± 0,35
250 mg/kg	D ₇	15,83 ± 0,17	33,58 ± 0,14	1,07 ± 0,13	15,00 ± 1,16*	81,23 ± 1,05**	2,79 ± 0,15
	D ₁₄	15,90 ± 0,12	33,30 ± 0,18	1,23 ± 0,12	9,39 ± 1,05**	86,85 ± 1,19**	2,38 ± 0,26
500 mg/kg	D ₇	15,68 ± 0,10	33,24 ± 0,21	1,25 ± 0,13	18,14 ± 1,76	77,79 ± 1,77	2,86 ± 0,18
	D ₁₄	15,80 ± 0,04	33,58 ± 0,15	1,29 ± 0,12	12,08 ± 1,27	83,33 ± 12,32	2,75 ± 0,16

Os valores representam a média ± e.p.m., n = 14 animais (ANOVA seguido do teste de *Dunnnett*, com diferença significativa quando * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). VCM: Volume Corpuscular Médio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média. D₇: após 7 dias da administração do extrato; D₁₄: após 14 dias da administração do extrato.

4.4.3.4. AVALIAÇÃO DO CONSUMO MÉDIO DE ÁGUA E RAÇÃO E VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Os sinais de toxicidade sistêmica são definidos a partir da redução na massa corporal dos animais experimentais, na redução dos consumos de água e ração, alterações comportamentais, alteração na massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas (RAUBER et al., 2006).

A determinação do consumo de água e ração são parâmetros importantes dentro do estudo de segurança de um produto com propósitos terapêuticos (IVERSEN & NICOLAYSEN, 2003). A administração do extrato etanólico de *L. pinaster* causou redução do consumo de ração e água somente no dia 1 (dados em vermelho) das três doses testadas em ambos os grupos de machos e fêmeas. Isto se deve provavelmente ao produto administrado, já que no grupo controle não houve essa redução. Estes dados são justificados com os achados no método de campo aberto, sendo que o extrato provocou sedação (redução da locomoção) no dia da administração. Ao fim dos tratamentos o consumo de ração e água atingiu um nível estável próximo ou superior ao do início do experimento (veja Tabelas 4.10 e 4.11).

Tabela 4.10 - Consumo médio de ração por camundongo que recebeu o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* em dose única.

4.10.1. Camundongos machos acompanhados até o 7º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (g/animal)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7
Controle	6,37	6,42	6,61	6,80
125 mg/kg	6,18	2,97	5,50	6,32
250 mg/kg	6,27	3,31	6,38	7,13
500 mg/kg	6,08	3,22	6,52	6,85

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.10.2. Camundongos fêmeas acompanhadas até o 7º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (g/animal)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7
Controle	4,92	4,92	4,31	4,88
125 mg/kg	7,17	4,23	6,92	6,80
250 mg/kg	6,22	3,52	6,04	7,17
500 mg/kg	6,77	4,92	5,59	4,73

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.10.3. Camundongos machos acompanhados até o 14º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (g/animal)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	Dia 14
Controle	4,23	4,66	6,52	5,58	6,75	7,66
125 mg/kg	4,09	3,50	6,17	6,76	7,17	8,04
250 mg/kg	4,51	4,00	6,25	6,00	6,90	7,48
500 mg/kg	4,49	3,00	6,46	6,96	6,74	7,29

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.10.4. Camundongos fêmeas acompanhadas até o 14º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (g/animal)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	Dia 14
Controle	5,88	5,94	5,47	4,39	5,52	6,00
125 mg/kg	4,70	3,87	3,53	4,70	5,00	4,83
250 mg/kg	5,53	2,13	6,04	6,76	5,87	5,83
500 mg/kg	6,47	4,82	6,79	5,63	6,83	6,87

Os valores representam a média, n=14 animais.

Tabela 4.11 - Consumo médio de água por camundongo que recebeu o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* em dose única.

4.11.1. Camundongos machos acompanhados até o 7º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (ml/animal)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7
Controle	6,75	6,75	6,50	6,25
125 mg/kg	6,25	3,75	4,37	5,00
250 mg/kg	6,25	4,37	5,63	6,25
500 mg/kg	6,25	3,75	5,00	6,25

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.11.2. Camundongos fêmeas acompanhadas até o 7º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (ml/animal)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7
Controle	4,17	4,17	4,17	4,17
125 mg/kg	5,00	4,17	5,00	4,17
250 mg/kg	5,00	3,33	5,00	4,17
500 mg/kg	5,83	4,17	4,17	4,17

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.11.3. Camundongos machos acompanhados até o 14º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (ml/animal)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	Dia 14
Controle	5,00	5,63	5,63	5,63	8,13	8,44
125 mg/kg	5,00	3,50	7,50	8,13	7,50	7,50
250 mg/kg	5,00	4,38	7,50	6,88	7,50	7,19
500 mg/kg	5,00	3,88	7,50	6,25	6,25	8,13

Os valores representam a média, n=14 animais.

4.11.4. Camundongos fêmeas acompanhadas até o 14º dia após a administração do extrato.

Grupo	Consumo médio (ml/animal)					
	Dia 0	Dia 1	Dia 4	Dia 7	Dia 11	Dia 14
Controle	4,17	4,17	4,17	4,17	4,17	4,17
125 mg/kg	5,00	4,17	5,00	6,67	5,83	4,17
250 mg/kg	5,00	2,50	5,00	4,17	5,00	4,17
500 mg/kg	4,17	3,33	4,17	4,17	5,00	5,00

Os valores representam a média, n=14 animais.

O acompanhamento do peso corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (JAHN & GÜNZEL, 1997).

Mudanças no peso corporal têm sido usadas como um indicador de efeitos adversos de drogas e substâncias químicas. Geralmente, a redução de mais de 10% do peso corporal inicial dos animais é um simples e sensível sinal de toxicidade após a exposição a uma substância tóxica (RAZA et al., 2002; TEO et al., 2002).

Após 7 dias da administração oral em dose única do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, os machos tratados com a dose de 125 mg/kg apresentaram uma redução significativa ($P < 0,01$) na variação do peso corporal comparado ao grupo controle. O grupo controle ganhou 8,6% de peso corporal enquanto o grupo tratado com a dose de 125 mg/kg ganhou 6,2% (vide Figura 4.5). Para os machos acompanhados até 14º dia, a variação do peso dos animais tratados com a dose de 500 mg/kg (ganho de 39,9%) ($P \leq 0,05$) foi maior do que no grupo controle (ganho de 33,4%) (Figura 4.6).

As fêmeas que receberam a dose de 500 mg/kg de LPiE após 7 e 14 dias da administração do extrato não apresentaram alteração significativa no peso corporal em relação ao grupo controle, apesar de terem perdido 0,8% e 5,9% de seus pesos, respectivamente, enquanto o controle ganhou 2,3% após 7 dias e 4,7% após 14 dias (Figuras 4.7 e 4.8).

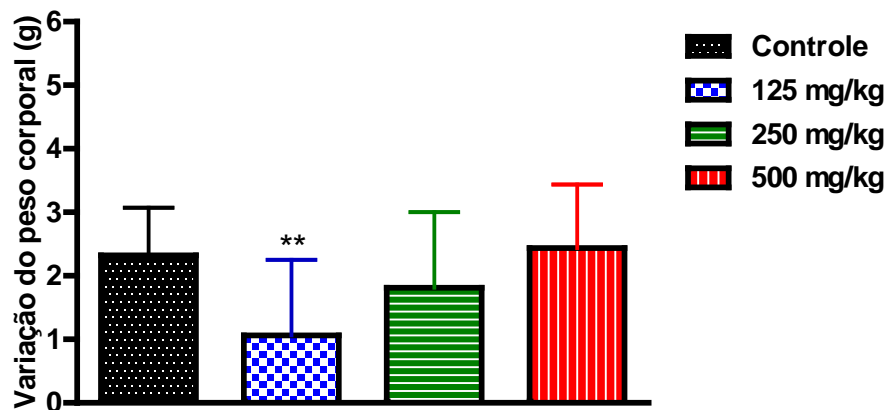


Figura 4.5 – Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos machos após 7 dias da administração de uma única dose. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. (ANOVA seguido do teste de *Dunnett*, com diferença significativa quando ** $P < 0,01$).

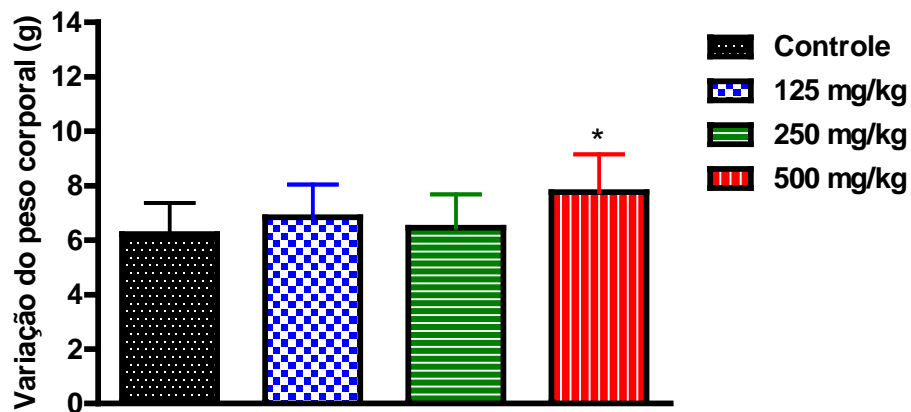


Figura 4.6 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos machos após 14 dias da administração de uma única dose. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 8 animais. (ANOVA seguido do teste de *Dunnett*, com diferença significativa quando * $P \leq 0,05$).

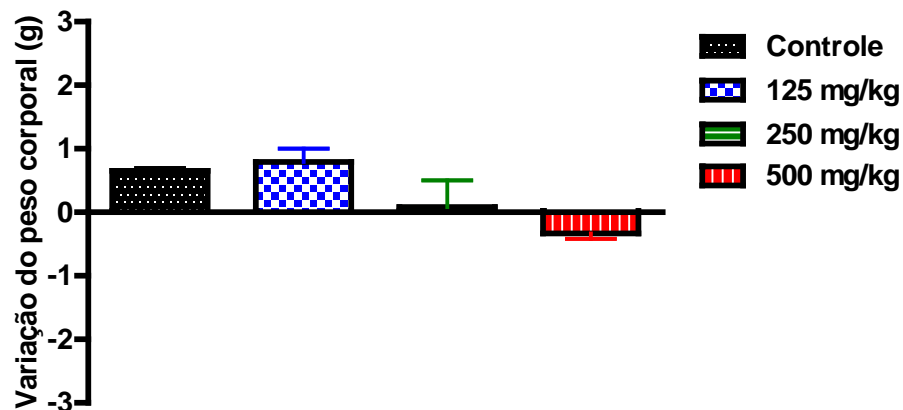


Figura 4.7 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos fêmeas após 7 dias da administração de uma única dose. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6 animais. (ANOVA seguido do teste de *Dunnett*)

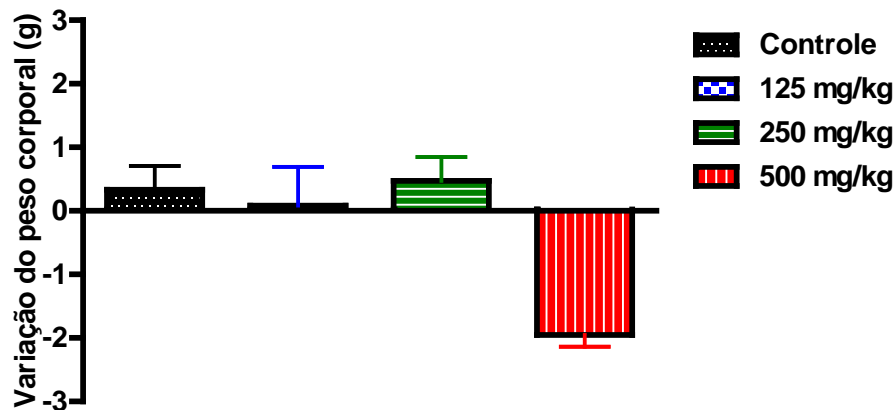


Figura 4.8 - Efeito do tratamento com veículo ou extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em diferentes doses, por via oral, sobre a variação do peso corporal em camundongos fêmeas após 14 dias da administração de uma única dose. Os valores representam a média \pm e.p.m. de 6 animais. (ANOVA seguido do teste de *Dunnett*).

Os resultados obtidos sugerem que o procedimento experimental de administração do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* por meio de sonda rígida orogástrica, assim como as manipulações diárias dos animais, não comprometeram o estado nutricional e o crescimento dos camundongos tratados com o veículo ou com o extrato após 7 e 14 dias da administração.

Como em todos os estudos de toxicidade, observações clínicas e mudanças no peso corporal podem ser bons indicadores do estado de saúde do animal. Diminuição do peso corporal ou redução do ganho de peso pode refletir uma variedade de respostas incluindo rejeição pela ração por causa da anorexia induzida pelo tratamento ou pela toxicidade sistêmica (JAHN & GÜNZEL, 1997).

4.4.3.5. AVALIAÇÃO DOS PESOS ÚMIDOS DOS ÓRGÃOS

Mudanças no peso dos órgãos são frequentemente associadas aos efeitos do tratamento (SELLERS et al., 2007). Em experimentos toxicológicos, a comparação dos pesos dos órgãos de animais tratados e não tratados é usada para prever o efeito tóxico do teste e para identificar possíveis órgãos alvo, por exemplo, órgãos com efeitos adversos provocados pela exposição. E ainda, a avaliação dos pesos dos órgãos em estudos toxicológicos é um componente integrante na avaliação de substâncias ativas (WOLFSEGGGER et al., 2009).

No presente trabalho, o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* não induziu mudanças significativas no peso relativo do encéfalo e pulmão dos camundongos de ambos os sexos quando comparados aos seus respectivos grupos controles. Entretanto houve um aumento de 13,3 % no peso relativo dos rins no grupo de machos tratados com a dose de 125 mg/kg em comparação ao grupo controle, após 14 dias da administração do extrato. Houve também uma diminuição no peso relativo dos rins de 8% no grupo de machos tratados com a dose de 500 mg/kg em relação ao grupo controle, após 14 dias da administração. Para as fêmeas, houve diminuição no peso relativo dos rins na dose de 250 mg/kg após 7 e 14 dias da administração do extrato. Esta diminuição foi de 13,6 e 14,5 %, respectivamente. Em relação ao fígado houve diminuição do peso relativo nos machos após 7 dias da administração nas três doses testadas (125; 250 ou 500 mg/kg) de 15,3%, 15,7% e 17,2%, respectivamente. Nos machos após 14 dias da administração houve diminuição do peso relativo do fígado de 7,3 e 7,5 % nas doses de 250 ou 500 mg/kg, respectivamente. E nas fêmeas só houve diminuição do peso relativo do fígado de 21,2% na dose de 250 mg/kg após 14 dias da administração (Tabela 4.12).

Alterações no peso do fígado podem sugerir mudanças relacionadas ao tratamento incluindo hipertrofia hepatocelular (por exemplo, indução enzimática ou proliferação do peroxissoma) (GREAVES, 2007; AMACHER et al., 2006; JUBERG et al., 2006). O peso do fígado pode estar elevado em estudos realizados em intervalos menores que 7 dias por substâncias potentes que induzem enzimas hepáticas (GREAVES, 2007). E os dados do presente estudo demonstram que não houve um aumento significativo no fígado dos animais tratados com as três doses após 7 ou 14 dias da administração.

Mudanças no peso dos rins podem refletir na toxicidade renal, hipertrofia tubular ou nefropatia progressiva crônica (GREAVES, 2007). No presente estudo encontrou-se um aumento significativo dos rins apenas nos machos tratados com a menor dose.

Mudanças no peso do cérebro são raramente associadas com neurotoxicidade (SELLERS et al., 2007). E isso pode ser evidenciado neste estudo, visto que houve alterações neurológicas, mas que não afetaram o peso deste órgão.

Segundo a Sociedade de Patologia Toxicológica, estudos que não envolvam a administração de substâncias por inalação, o peso dos pulmões possuem pouco valor nas avaliações microscópicas e por isso são opcionais (SELLERS et al., 2007). O trato respiratório é frequentemente identificado como um sítio de toxicidade para xenobióticos químicos inalados (BOGDANFFY & SARANGAPANI, 2003). Os dados do presente estudo corroboram com esta afirmativa, visto que a solução administrada não possui substâncias químicas inalatórias.

Tabela 4.12 - Relação entre os pesos dos órgãos e o peso corpóreo de camundongos acompanhados até o 7º e 14º dias após a administração do extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, em dose única.

Grupo	n	Sexo		Fígado	Rins	Encéfalo	Pulmão
Controle	16	Machos	D ₇	5,74 ± 0,17	0,66 ± 0,01	1,19 ± 0,07	0,53 ± 0,02
			D ₁₄	5,33 ± 0,10	0,75 ± 0,01	1,24 ± 0,03	0,53 ± 0,01
	12	Fêmeas	D ₇	4,55 ± 0,19	0,59 ± 0,01	1,31 ± 0,09	0,67 ± 0,07
			D ₁₄	5,48 ± 0,21	0,62 ± 0,03	1,75 ± 0,13	0,66 ± 0,05
125 mg/kg	16	Machos	D ₇	4,86 ± 0,08 *	0,67 ± 0,01	1,20 ± 0,06	0,52 ± 0,02
			D ₁₄	5,43 ± 0,11	0,85 ± 0,02 *	1,22 ± 0,03	0,52 ± 0,01
	12	Fêmeas	D ₇	4,28 ± 0,20	0,54 ± 0,01	1,21 ± 0,06	0,58 ± 0,03
			D ₁₄	5,07 ± 0,10	0,56 ± 0,01	1,56 ± 0,09	0,59 ± 0,03
250 mg/kg	16	Machos	D ₇	4,84 ± 0,08 *	0,69 ± 0,01	1,13 ± 0,02	0,48 ± 0,01
			D ₁₄	4,94 ± 0,14 *	0,73 ± 0,01	1,19 ± 0,04	0,53 ± 0,01
	12	Fêmeas	D ₇	4,43 ± 0,18	0,51 ± 0,02 *	1,32 ± 0,07	0,58 ± 0,02
			D ₁₄	4,32 ± 0,05 *	0,53 ± 0,01**	1,69 ± 0,21	0,62 ± 0,02
500 mg/kg	16	Machos	D ₇	4,75 ± 0,16 *	0,70 ± 0,02	1,13 ± 0,04	0,48 ± 0,01
			D ₁₄	4,93 ± 0,07 *	0,69 ± 0,02 *	1,17 ± 0,03	0,54 ± 0,01
	12	Fêmeas	D ₇	4,14 ± 0,24	0,57 ± 0,02	1,39 ± 0,07	0,59 ± 0,07
			D ₁₄	5,32 ± 0,15	0,58 ± 0,02	1,67 ± 0,07	0,65 ± 0,05

Os valores representam a média ± e.p.m., n = número de animais utilizados no experimento (ANOVA seguido do teste de *Dunnnett*, com diferença significativa quando * $P \leq 0,05$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,001$). D₇: após 7 dias da administração do extrato; D₁₄: após 14 dias da administração do extrato.

4.4.3.6. AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

No estudo histopatológico em camundongos machos e fêmeas submetidos a testes de investigação de toxicidade aguda, com a administração de doses de 125; 250 ou 500 mg/kg, do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE), os seguintes órgãos foram examinados: rins, fígado, encéfalo e pulmões. Esta avaliação foi realizada em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) para visualização do núcleo e citoplasma no Laboratório de Imunopatologia, NUPEB, UFOP sob a colaboração da professora Dr^a Cláudia Martins Carneiro.

Os cortes histológicos de pulmão dos animais do grupo controle e tratados com diferentes doses de *L. pinaster* apresentaram alvéolos com espessura regular, capilares exibindo calibre normal contendo hemácias, vasos e bronquíolos de aspecto e tamanhos normais.

Nos cortes histológicos do encéfalo dos animais do grupo controle e tratados com *L. pinaster* não foram encontrados sinais de lesão e morte celular.

Os cortes histológicos dos rins dos animais controle mostraram zona cortical e medular de aspecto normal, com cápsula conjuntiva de espessura adequada. Os glomérulos, cápsula de Bowman e tubos também apresentaram aspecto normal (Figura 4.9 A e B). Os cortes histológicos dos rins tratados com LPiE mostraram alterações que podem ser dose dependente, mas somente uma análise morfométrica confirmaria isso. Tanto em machos quanto nas fêmeas nas doses de 125 ou 250 mg/kg, os rins apresentaram degeneração tubular sem perda glomerular (Figura 4.9 C), após 7 dias da administração do extrato. Já na dose 500 mg/kg os rins, além da degeneração tubular, apresentaram também congestão glomerular e uma discreta inflamação (Figura 4.9 D). Nos animais submetidos ao tratamento de LPiE nas doses de 125 ou 250 mg/kg avaliados após 14 dias da administração se observa que no panorama estrutural houve degeneração vacuolar tubular; processo congestivo glomerular (Figura 4.9 E); perda glomerular discreta; dilatação dos túbulos com deposição de substância eosinofílica na luz dos mesmos. Na dose de 500 mg/kg após 14 dias da administração do extrato, além dessas alterações observou-se um infiltrado inflamatório moderado (Figura 4.9 F).

Os cortes histológicos de fígado dos animais do grupo controle apresentaram parênquima bem preservado com a cápsula de tecido conjuntivo íntegra, lóbulos de tamanho normal e células com núcleo e membrana bem definidos (Figura 4.10 A). Os animais que receberam as doses de 125 ou 250 mg/kg, após 7 dias da administração do extrato,

apresentaram degeneração vacuolar principalmente nos hepatócitos localizados nas regiões perivascular sem processo inflamatório (Figura 4.10 B e C). O parênquima nos animais tratados com ambas as doses apresentou aspecto semelhante aos dos animais controle, salvo análise mais profunda e quantificação para morfometria. Na dose de 500 mg/kg após 7 dias da administração, a histopatologia do fígado apresentou moderada congestão venular associada a fenômenos de dilatação e congestão sinusoidais e presença de células do infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) parenquimal (Figura 4.10 D e E). Os animais tratados com as doses de 125 ou 250 mg/kg, após 14 dias da administração do extrato, apresentaram um moderado infiltrado inflamatório parenquimal e perivascular; necrose hepática focal (Figura 4.10 F e G) circundada por células do infiltrado inflamatório polimorfonuclear e degeneração hidrópica. A histopatologia do fígado na dose de 500 mg/kg após 14 dias da administração do extrato, revelou um processo inflamatório intenso além das alterações encontradas nas doses menores (Figura 4.10 H e I).

Para verificar se o extrato induzia processo inflamatório no fígado de maneira tempo/dose dependentes realizou-se uma análise morfométrica que consistiu na quantificação dos núcleos celulares nos grupos avaliados.

Foram comparados os grupos controle e os tratados com diferentes doses de *L. pinaster* após 7 e 14 dias da exposição ao extrato para verificar se havia um efeito dose dependente no fígado. Verificou-se que houve uma diminuição no número de núcleos celulares nos machos que receberam a dose de 125 mg/kg acompanhados por 7 dias (Tabela 4.13 e Figura 4.11). Para os machos acompanhados por 14 dias, observou-se uma diminuição significativa no número de núcleos celulares do fígado nas três doses testadas quando comparadas aos seus respectivos grupos controles, sendo que esta diminuição foi maior na dose de 250 mg/kg e igual nas doses de 125 e 500 mg/kg ($250 > 125 = 500$). Nas fêmeas, verificou-se um aumento significativo ($P < 0,001$) do processo inflamatório nas três doses testadas quando comparadas aos grupos controle, nos animais acompanhados por 7 e 14 dias, sendo que nas fêmeas D₇ o efeito foi maior na dose de 500 mg/kg e igual nas doses de 250 e 125 mg/kg ($500 > 250 = 125$) e para as fêmeas D₁₄ o aumento foi igual nas três doses ($125 = 250 = 500$) (Tabela 4.13 e Figura 4.11).

Foram comparados os grupos de machos tratados com o extrato após 7 e 14 dias da administração para observar se havia um efeito tempo dependente no órgão em questão. Verificou-se que houve um aumento significativo do infiltrado inflamatório no 14º dia após

tratamento em relação ao 7º dia entre os grupos controles (D₇ e D₁₄) e entre os animais tratados com a dose de 125 mg/kg (D₇ e D₁₄) ($P < 0,001$). Nos animais tratados com 250 mg/kg verificou-se uma diminuição significativa dos núcleos celulares ($P < 0,001$) no dia 14 em relação ao dia 7. E para as doses de 500 mg/kg não houve diferença significativa entre os dois tempos analisados (Tabela 4.13 e Figura 4.11). As fêmeas que receberam tratamento com veículo e aquelas que receberam extrato na dose de 500 mg/Kg não apresentaram diferenças estatísticas em relação à células inflamatórias nos dois tempos analisados. Porém, o tratamento com as doses 125 ou 250 mg/kg do extrato induziram processo inflamatório intenso e significativo no 14º dia após o tratamento quando comparado ao 7º dia. (Tabela 4.13 e Figura 4.11).

Foram comparados os grupos de machos e fêmeas expostos ao LPiE após 7 e 14 dias da administração para verificar se o extrato possui efeito diferente entre os sexos. Em relação aos grupos que receberam somente veículo, observou-se aumento de núcleos celulares entre as fêmeas e os machos no 7º dia após o tratamento. Comparando-se os grupos que receberam diferentes doses de extrato etanólico bruto de *L. pinaster* verificou-se um aumento de células inflamatórias nas fêmeas em relação aos machos nos dois tempos analisados. (Tabela 4.13 e Figura 4.11).

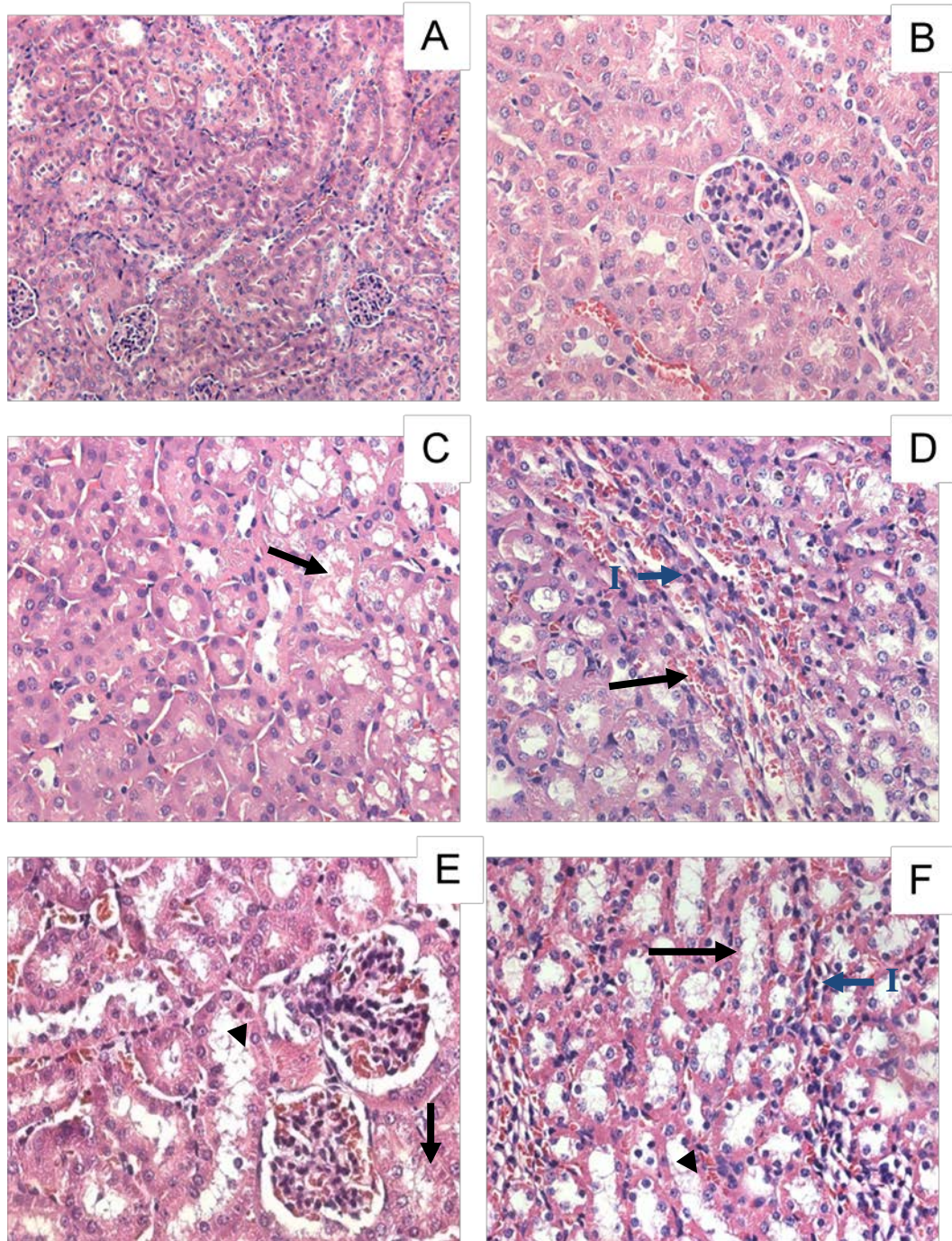


Figura 4.9 - Fotomicrografias de seções de rim de camundongos *Swiss* submetidos à avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE), administrado por via oral em 3 distintas doses (125; 250 ou 500 mg/Kg de peso corporal), de acordo com o sexo e o tempo após tratamento: A) e B) Animais do grupo controle mostrando rim com aspecto normal; C) Animais que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando rim com degeneração tubular (seta); D) Animais que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando rim com congestão (seta) e discreta inflamação (I); E) Animais que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando rim com degeneração (seta) e dilatação tubular (cabeça de seta); F) Animais que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando rim com degeneração (seta) e dilatação tubular (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório moderado (I) (Hematoxilina Eosina, aumento de 40X; A: aumento de 20X).

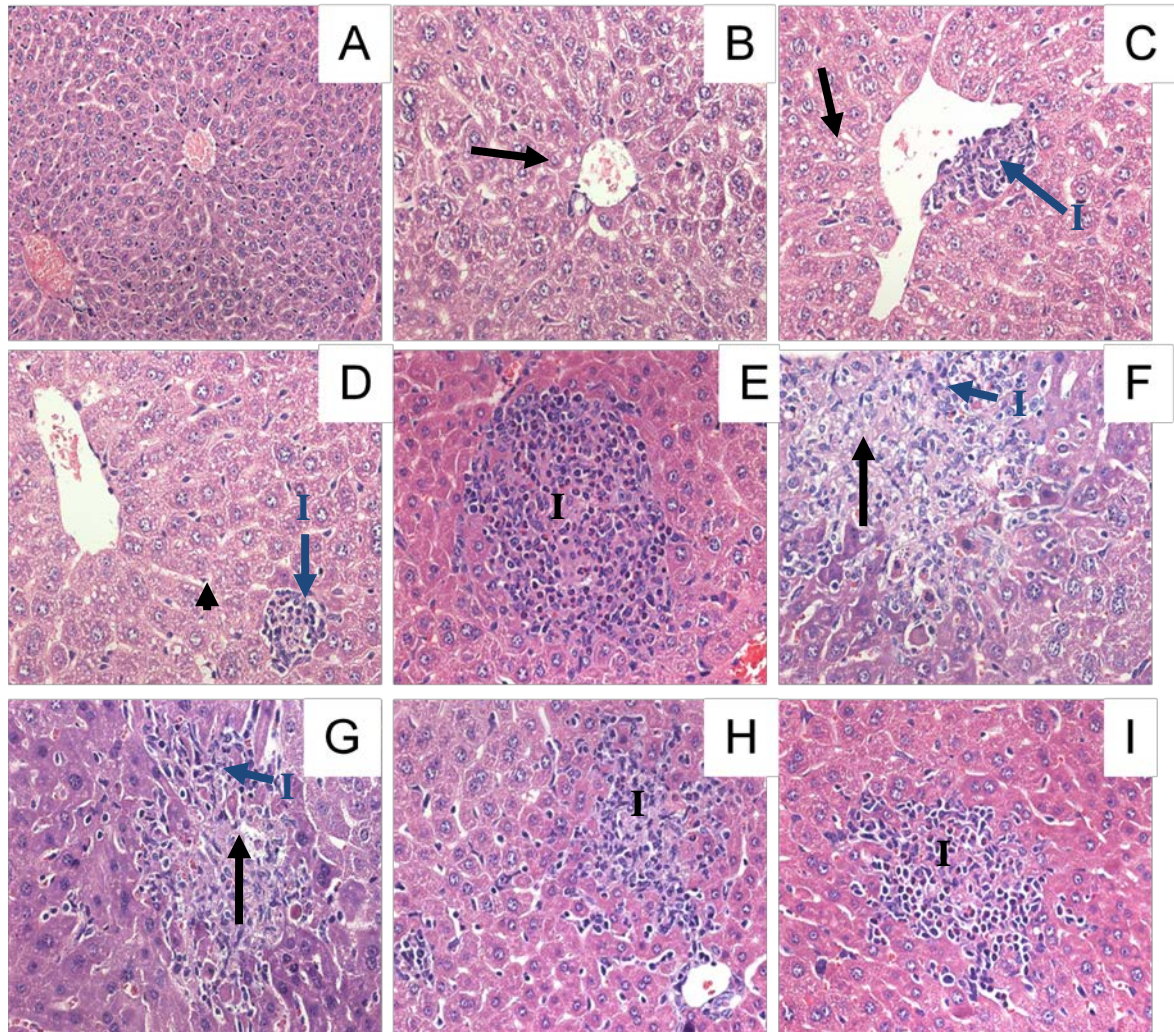


Figura 4.10 - Fotomicrografias de seções de fígado de camundongos *Swiss* submetidos à avaliação da toxicidade do extrato etanólico bruto de *L. pinaster* (LPiE), administrado por via oral em 3 distintas doses (125; 250 ou 500 mg/Kg de peso corporal), de acordo com o sexo e o tempo após tratamento: **A**) Animais do grupo controle mostrando fígado com aspecto normal; **B**) Machos que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando fígado com degeneração vacuolar perivascular (seta); **C**) Fêmeas que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando fígado com degeneração vacuolar (seta) e infiltrado inflamatório perivascular (I); **D**) Machos que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando fígado com dilatação de sinusóides (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (I); **E**) Fêmeas que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (7 dias) mostrando fígado com infiltrado inflamatório intenso (I); **F**) Machos que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando fígado com infiltrado inflamatório (I) e necrose (seta); **G**) Fêmeas que receberam 125 ou 250mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando fígado com infiltrado inflamatório (I) e necrose (seta); **H**) Machos que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando fígado com infiltrado inflamatório intenso (I); **I**) Fêmeas que receberam 500mg/Kg de peso corporal de LPiE (14 dias) mostrando fígado com infiltrado inflamatório intenso (I) (Hematoxilina Eosina, aumento de 40X; **A**: aumento de 20X).

Tabela 4.13 – Frequência de núcleos celulares por área ($1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) no fígado de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com veículo ou diferentes doses de extrato etanólico bruto de *L. pinaster* acompanhados até o 7º ou 14º dias após a administração dos extratos.

Grupo	n	Sexo		nº de núcleos celulares/área			
Controle	8	Machos	D ₇	194,80 ± 4,65			
			D ₁₄	233,30 ± 5,64	**		
	6	Fêmeas	D ₇	264,40 ± 3,48	**		
			D ₁₄	248,20 ± 2,91	**		
125 mg/kg	8	Machos	D ₇	158,30 ± 3,52	*		
			D ₁₄	196,20 ± 3,64	*	**	
	6	Fêmeas	D ₇	302,60 ± 3,39	*	**	
			D ₁₄	340,10 ± 3,46	*	**	● ○
250 mg/kg	8	Machos	D ₇	208,80 ± 3,43			
			D ₁₄	167,70 ± 3,68	*	**	
	6	Fêmeas	D ₇	310,10 ± 3,43	*	**	
			D ₁₄	355,00 ± 8,29	*	**	● ○
500 mg/kg	8	Machos	D ₇	204,40 ± 3,72			
			D ₁₄	183,20 ± 3,97	*		
	6	Fêmeas	D ₇	349,00 ± 6,67*	*	**	
			D ₁₄	340,60 ± 3,99	*	**	○

Os valores representam a média ± e.p.m. das 8 e 6 lâminas para machos e fêmeas respectivamente, n = número de animais utilizados no experimento (ANOVA seguido do teste de *Tukey*). D₇: após 7 dias da administração do extrato; D₁₄: após 14 dias da administração do extrato.

**P* < 0,001 comparado aos seus respectivos grupos controle;

***P* < 0,05 comparado ao grupo de machos D₇;

•*P* < 0,001 comparado ao grupo de fêmeas D₇.

°*P* < 0,001 comparado ao grupo de machos D₁₄;

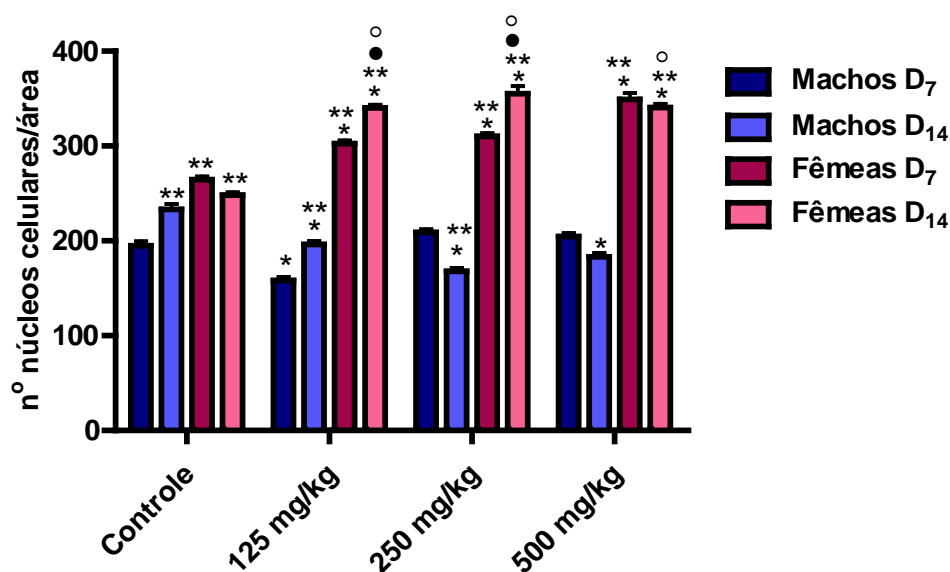


Figura 4.11 – Análise morfométrica do processo inflamatório no fígado de camundongos *Swiss* machos e fêmeas tratados com veículo ou diferentes doses de extrato etanólico bruto de *L. pinaster* acompanhados até o 7º ou 14º dias após a administração dos extratos. As colunas são a média \pm e.p.m. dos grupos de machos (n=8) e fêmeas (n=6) analisados (ANOVA seguido do teste de *Tukey*). D₇: após 7 dias da administração do extrato; D₁₄: após 14 dias da administração do extrato.

* $P < 0,001$ comparado aos seus respectivos grupos controle;

** $P < 0,05$ comparado ao grupo de machos D₇;

° $P < 0,001$ comparado ao grupo de fêmeas D₇.

° $P < 0,001$ comparado ao grupo de machos D₁₄;

Diante do exposto verifica-se que o extrato não possui efeito dose dependente no fígado de machos e fêmeas. Embora as fêmeas tenham apresentado um aumento significativo, o efeito parecia não depender das doses. Quando se avaliou o efeito do tempo nos tratamentos, observou-se que nas fêmeas o efeito hepatotóxico do extrato, nas doses de 125 ou 250 mg/kg de peso corporal, aparece após um período mais prolongado (14 dias) evidenciado pela presença de um processo inflamatório mais intenso. Porém, nos machos o tempo parece não ter efeito significativo. E por fim, foi comparado o efeito do extrato no fígado sobre os sexos e verificou-se que as fêmeas em todas as doses dos tempos D₇ e D₁₄ apresentavam um aumento da citotoxicidade quando comparadas aos machos. Isto demonstra que as fêmeas são mais susceptíveis que os machos quando se administra oralmente, em dose única, o extrato etanólico bruto de *L. pinaster*. Segundo Stickel e colaboradores, 2005, diversas plantas medicinais podem causar hepatotoxicidade sendo que a maioria dessas plantas afeta mais indivíduos do sexo feminino. Essa diferença de gênero não estava relacionada com a probabilidade das mulheres utilizarem mais essas preparações, mas sim

com a maior susceptibilidade destas a induzirem danos hepáticos quando as usavam (KESSLER et al., 2001).

Juntamente ao fígado, os rins são os mais importantes órgãos de desintoxicação (INUI et al., 2000).

O fígado é um órgão com alta atividade metabólica visto que, grande parte das substâncias absorvidas pelo intestino tem passagem pelo fígado, o qual tem a função de metabolizar, armazenar ou sintetizar estas substâncias colaborando assim para a homeostasia corpórea. Este órgão possui grande perfusão sanguínea e, em função disto, toda substância absorvida pelo organismo atinge rapidamente as células hepáticas. Ademais, o fígado é responsável por promover a eliminação de xenobióticos nocivos ou não, do organismo, tais como drogas (BORGES et al., 2002; LEMES & BRACCINI, 2004).

As substâncias estranhas são predominantemente biotransformadas no fígado pela ação de enzimas que metabolizam as drogas incluindo as enzimas microsossomais do citocromo P450 (CYP), monooxigenases multifuncionais, glutatona-S-transferases, sulfotransferases e UDP-glicuronosiltransferases (STICKEL et al., 2005). Investigações mostraram que mais de 50% de substâncias químicas clinicamente utilizadas são oxidadas pelo citocromo P450 3A4 e cerca de 30% pelo citocromo P450 2D6 (RENDIC & DI CARLO, 1997). A inibição da enzima metabolizadora de drogas pode conduzir a um aumento no nível plasmático de substâncias administradas concomitantemente, prolongar os efeitos farmacológicos ou aumentar a toxicidade induzida por drogas (SUBEHAN et al., 2006). Além das CYP existem transportadores, tais como o transportador multidrogas glicoproteína-P (P-gP) (que são capazes de exportar dos hepatócitos uma variedade de substâncias químicas, inclusive drogas, xenobióticos, produtos naturais e peptídeos) (CHIELI & ROMITI, 2008).

Compostos polifenólicos podem ser precursores de quinonas ou de intermediários quinonametídeos que são inibidores das CYP (MURRAY, 2006). Drogas que inativam as CYP geralmente possuem grupos funcionais reconhecíveis que são oxidados a produtos reativos. Assim, drogas com cadeias laterais que contem ligação insaturada carbono-carbono e sistemas de anéis furano estão associadas à inativação irreversível das CYP (MURRAY, 1997, SUBEHAN et al., 2007). As lactonas sesquiterpênicas presentes na espécie *L. pinaster* possuem ação citotóxica contra hepatócitos humanos e causam alergia na pele (PICMAN, 1986). Elas possuem um anel furano capaz de inibir as CYP e assim causar hepatotoxicidade. A espécie *Arnica montana*, também rica em lactonas sesquiterpênicas, é considerada pela FDA

uma “planta perigosa” e seu uso não é permitido em medicamentos alopáticos por via oral (MACIEL et al., 2006).

Testes *in vitro* mostraram que os flavonóides: quercetina, kampferol, apigenina e galangina e poliacetilenos podem modular a atividade da P-gP (CHIELI & ROMITI, 2008). Muitas dessas substâncias estão presentes no extrato etanólico bruto de *L. pinaster*. Assim sendo, as alterações hepatocelulares encontradas nos presentes ensaios podem ser atribuídas as atividades tóxicas dessas substâncias.

Os rins situam-se acima da cintura contra a parede posterior da cavidade abdominal, sendo o rim direito levemente inferior ao esquerdo. A unidade funcional dos rins é o nefron, este é constituído de corpúsculo renal, túbulos contorcidos e alça de Henle (TORTORA & GRABOWSK, 2002). Estes órgãos são muito sensíveis à ação de agentes tóxicos. Uma razão para isto é o fato de que os rins, embora representem apenas 0,4 % do peso corporal, estão excessivamente expostos a agentes tóxicos presentes na circulação (MAXIE & NEWMAN, 2007; OLSEN & SOLEZ, 1994). Outra razão é que o néfron, com sua capacidade de concentrar o filtrado glomerular, possa estar exposto a concentrações muito altas de agentes tóxicos em qualquer uma de suas porções. Os túbulos são os mais sensíveis a influências tóxicas, em parte porque possuem um alto consumo de oxigênio e sistemas enzimáticos vulneráveis e em parte porque podem ser usados como transportadores de toxinas e serem danificados por elas (OLSEN & SOLEZ, 1994). Segundo Capasso e colaboradores, 2000, diversas plantas medicinais que possuem terpenos e saponinas podem ser tóxicas para os rins. Recentes estudos demonstraram que extratos que continham saponinas, mesmo em baixas concentrações, eram capazes de promover toxicidade às células do epitélio renal (UHLIG et al., 2007). Assim, os achados histopatológicos dos rins presentes neste estudo demonstram que constituintes químicos encontrados no extrato etanólico bruto de *L. pinaster*, tais como saponinas possam ser excretados via rins e provocarem efeitos adversos nesses órgãos.

A partir então de todos os resultados apresentados de avaliação da toxicidade aguda, podemos concluir que o extrato etanólico bruto de *L. pinaster* administrado por via oral nas três doses, apresenta toxicidade às células renais e hepáticas. Serão necessários estudos adicionais para verificar se as alterações observadas são reversíveis e que possibilitem a recuperação tecidual. Além disso, o presente estudo avaliou somente administração de dose única do extrato e a avaliação de multidoses, por exemplo, por 30 dias, também será necessária atendendo a Resolução nº 90 de 2004 da ANVISA.

5. CONCLUSÕES

5.1. CONCLUSÕES GERAIS

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

O extrato etanólico de *L. pinaster* e suas frações, principalmente a metanólica são fortes candidatos a agentes anti-inflamatórios tópicos sendo tão eficazes quanto o medicamento cataflam. As evidências obtidas neste trabalho reforçam cientificamente a validade de seu uso popular no tratamento da inflamação e que a via tópica é adequada para sua utilização.

Além da capacidade anti-inflamatória, o extrato de *L. pinaster* nas doses de 500 e 750 mg/kg apresentou efeito analgésico semelhante aos fármacos utilizados no tratamento de dores mais brandas e mais fortes, tais como a dipirona e a morfina, mostrando que este extrato vegetal possui potencial para fazer parte deste arsenal farmacológico. Isto demonstra que os extratos e substâncias obtidas de produtos naturais, especialmente aqueles obtidos de plantas medicinais, ainda têm e continuarão tendo um lugar importante no processo de descoberta de novas drogas analgésicas.

Entretanto, como qualquer xenobiótico o extrato desta planta medicinal pode provocar possíveis efeitos adversos. Neste trabalho verificamos que o extrato provocou sedação sem causar prejuízo motor. Além deste efeito, o extrato induziu alterações morfológicas nos rins e fígado devendo possuir substâncias potencialmente tóxicas a estes órgãos. Mas, estudos adicionais de toxicidade são necessários, tais como de longa duração - em doses repetidas, de acordo com a legislação brasileira em vigor (Resolução n° 90 de 2004) para verificar se as alterações observadas são reversíveis ou não.

Contudo, se as alterações forem reversíveis, o extrato de *L. pinaster* poderá tornar-se matéria prima para a manipulação de um fitoterápico de administração oral com ação anti-inflamatória e analgésica, ampliando o poder de escolha da população.

6. PERSPECTIVAS

6.1. PERSPECTIVAS

A realização deste estudo permitiu responder questões acerca da atividade anti-inflamatória, analgésica e toxicidade aguda desta planta, porém muitas outras surgiram a partir dos dados obtidos neste trabalho, dentre elas:

- Obtenção das substâncias ativas presentes no extrato bruto e suas frações (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e metanólica);
- Submeter estas frações ao ensaio de atividade analgésica;
- Realizar estudos de nocicepção induzido por capsaicina e glutamato para verificar se a atividade analgésica do extrato etanólico bruto ocorre em nível central;
- Desvendar os mecanismos envolvidos na redução do edema provocado pela utilização do emulgel tópico formulado com o extrato etanólico e suas frações, tais como avaliação da inibição da ciclooxigenase, níveis de interleucinas, óxido nítrico, etc.
- Determinar a DL_{50} para o extrato administrado oralmente em dose única.
- Realizar estudo de toxicidade em doses repetidas durante 30 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7.1. REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; VALVERDE, S.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of hydroxyachilin, a sesquiterpene lactone from *Tanacetum microphyllum*. *Planta Medica*, v. 60, n. 3, p. 228-231, 1994.

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. *Pharmaceutical Biology*, v. 41, n. 2, p. 100-106, 2003.

AFOLAYAN, A. J.; MEYER, J. J. M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 57, p. 177-181, 1997.

AGARWAL, N.; PITCHUMONI, C. S.; SIVAPRASAD, A. V. Evaluating tests for acute pancreatitis. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 85, n. 4, p. 356-366, 1990.

AHMAD, M. M.; QURESHI, S.; SHAH, A.; QAZI, N. S.; RAO, R. M.; AL-BAKIRI, M. Anti-inflammatory activity of *Caralluma tuberculata* alcoholic extract. *Fitoterapia*, v. 46, p. 357-360, 1983.

AKKOL, E. K.; ARIF, R.; ERGUN, F.; YESILADA, E. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 122, n. 2, p. 210-215, 2009.

ALBERTI, A.; MORSICA, G.; CHEMELLO, L.; CAVALLETTO, D.; NOVENTA, F.; PONTISSO, P.; RUOL, A. Hepatitis C viraemia and liver disease in symptom-free individuals with anti-HCV. *The Lancet*, v. 340, n. 8821, p. 697-698, 1992.

ALHO, C. J. R.; MARTINS, E. S. De Grão em Grão, o Cerrado Perde Espaço (Cerrado - Impactos do Processo de Ocupação). Brasília, DF, Brasil: WWF – Fundo Mundial para a natureza, 66 p, 1995.

ALI, H.; HARIBABU, B.; RICHARDSON, R. M.; SNYDERMAN, R. Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *Advances in Rheumatology*, v. 81, n. 1, p. 1-28, 1997.

ALLMAN, M. A.; PANG, E.; YAU, D. F.; STEWART, P. M.; TILLER, D. J.; TRUSWELL, A. S. Elevated plasma vitamers of vitamin B₆ in patients with chronic renal failure on regular haemodialysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 46, n. 9, p. 679-683, 1992.

ALMEIDA, R. N.; NAVARRO, D. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Plants with central analgesic activity. *Phytomedicine*, v. 8, n. 4, p. 310-322, 2001.

AMACHER, D. E.; SCHOMAKER, S. J.; BOLDT, S. E.; MIRSKY, M. The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight and histological change in cynomolgus monkey toxicology studies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 4, p. 528-537, 2006.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research*, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE, M. P. Aspectos atuais do uso da dipirona no tratamento da dor. *Revista Prática Hospitalar*, v. 40, p. 111-118, 2005.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2005.

ARYA, S.; KUMAR, V. L. Anti-inflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediators of Inflammation*, v. 4, p. 228-232, 2005.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUIA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochemical Pharmacology*, v. 59, n. 11, p. 1387-1394, 2000.

AZEVEDO, A. O. *Caracterização farmacológica dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcolólico bruto e fracionado de Lychnophora pinaster (Arnica Mineira). Biomonitoramento farmacológico da triagem fitoquímica*. 2004. 113f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annual Review of Immunology*, v. 12, p. 141-179, 1994.

BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; ÁLVAREZ, M.; RASLAN, D. S.; SAÚDE, D. A.; AKSSIRA, A. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, v. 71, n. 1, p. 60-64, 2000.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: SEIZI, O. (Org.) *Fundamentos de Toxicologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 59-67.

BARROSO, G. M. *Arquivo do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, v. 14, p. 258, 1956.

BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RIBEIRO-PAES, J. T.; RODRIGUES, V. Effects of goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 3, p. 427-429, 1997.

BARTOLOMÉ, S. M.; CID, J. L. H.; FREDDI, N. Analgesia and sedation in children: practical approach for the most frequent situations. *Jornal de pediatria*, v. 83, n. 2, p. 71-82, 2007.

BAZON, J. N.; LOPES, J. L. C.; VICHNEWSKI, W.; DIAS, D. A.; NAGAMITI, K.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Cadinanes and other constituents from *Vernonia fruticulosa* and *Vernonanthura discolor*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 8, p. 1535-1536, 1997.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Research*, v. 924, n. 2, p. 219-228, 2002.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. *Imunologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 9-21.

BERGMEYER, H. U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry*, v. 24, n. 1, p. 58-73, 1978.

BERNTSON, G. G.; JANG, J. F.; RONCA, A. E. Brainstem systems and grooming behaviors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 525, p. 350-362, 1988.

BESSION, J. M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiological Reviews*, v. 67, n. 1, p. 67-186, 1987.

BIODIVERSITAS. Revisão das Listas das Espécies da Flora e da Fauna Ameaçadas de Extinção do Estado de Minas Gerais: Relatório Final, v. 2, Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 104 p., 2007.

BOGDANFFY, M. S.; SARANGAPANI, R. Physiologically-based kinetic modeling of vapours toxic to the respiratory tract. *Toxicology Letters*, v. 138, n. 1-2, p. 103-117, 2003.

BOHLIN, L. Structure - activity studies of natural products with anti-inflammatory effects. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*. Clarendon Press, Oxford, 1995, p. 137-161.

BOHLMANN, F., MOLLER, L., KING, R. M., ROBINSON, H. A guaianolide and other constituents from *Lychnophora* species. *Phytochemistry*, v.20, n. 5, p. 1149-1151, 1981.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. Progress in the chemistry of the *Vernoniae* (Compositae). *Plant Systematics and Evolution Suppl*, v. 4, p. 3-43, 1990.

BORELLA, J. C.; LOPES, J. L.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovilosissima*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 671-676, 1998.

BORGES, E. M.; MACHADO, M. R. F.; OLIVEIRA, F. S.; SOUZA, W. M.; DUARTE, J. M. B. Aspectos morfológicos do fígado do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, n. 2, p. 78-80, 2002.

BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, v. 55, n. 7, p. 809-813, 2000.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. *Pharmacology Review*, v. 42, n. 2, p. 127-154, 1990.

BRAGA, S. O uso sustentável da biodiversidade amazônica. In: VELLOSO, J. P. R.; ALBUQUERQUE, R. C. (Orgs.). *Amazônia vazia de soluções?: Desenvolvimento moderno baseado na biodiversidade*. Rio de Janeiro: José Olympio, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 90 de 16 de março de 2004. Determina a publicação da "GUIA PARA A REALIZAÇÃO DE ESTUDOS DE TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS". Diário Oficial da União (DOU), 18 de março de 2004.

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

BRITO, A. R. M. S. Toxicidade aguda (dose simples e doses repetidas), subcrônica e crônica. In: BRITO, A. R. M. S. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: Editora da Unicamp, Rio de Janeiro: Editora Três, 1994, p. 15-50.

BRITO, A. R. M. S. Legislação de Fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. (Ed.) *Plantas medicinais: arte e ciência, um guia de estudo interdisciplinar* São Paulo: UNESP, 1996, cap. 13, p. 187-197.

BRITO, F. A.; LIMA, L. A.; RAMOS, M. F. S.; NAKAMURA, M. J.; CAVALHER-MACHADO, S. C.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SAMPAIO, A. L. F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 40, n. 1, p. 105-115, 2007.

BRODY, T. *Nutritional Biochemistry*. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1999, 1006 p.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acid media. *Journal of the American Chemical Society*, v. 99, n. 5, p. 1359-1364, 1977.

BRUNETON, J. *Farmacognosia: Fitoquímica; Plantas medicinais*. Traduzido por Ángel Villar Del Fresno. Zaragoza (Espanha): Acribia, 2. ed., parte 3, 2001, p. 611-626.

BUKHARI, I. A.; KHAN, R. A.; GILANI, A. U.; SHAH, A. J.; HUSSAIN, J.; AHMAD, V. U. The analgesic, anti-inflammatory and calcium antagonist potential of *Tanacetum artemisioides*. *Archives Pharmacal Research*, v. 30, n. 3, p. 303-312, 2007.

CABRAL, A. C. S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Estudo fitoquímico da madeira de *Lychnophora ericoides* Mart. In: XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Recife. Resumos, p. 134, 2000.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 91-97, 2002.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M. Kinins in pain and inflammation. *Pain*, v. 87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research*, v. 14, n. 6, p. 401-418, 2000a.

CALIXTO, J. B. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. *Expert Opinion Emerging Drugs*, v. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappa B). *Planta Médica*, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; 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, n. 2, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A. L.; ANDRÉ, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; OSÓRIO, V. A.; AUGUSTIN, E. Atividade da peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n.7, p.637-643, 2004.

CANALLE, R.; BURIM, R. V.; LOPES, J. L. C.; TAKAHASHI, C. S. Assessment of the cytotoxic and clastogenic activities of the sesquiterpene lactone lychnopholide in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Detection and Prevention*, v. 25, n. 1, p. 93-101, 2001.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*, v. 71, suppl. 1, p. 58-65, 2000.

CARREGARO, A. B.; CASTRO, M. B.; MARTINS, F. S. Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 2, p. 191-195, 2005.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; MACHADO NETO, E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, Ano V, n. 11, p. 26-32 2007.

CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. *Drugs*, v. 52, suppl. 5, p. 13-23, 1996.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 816-24, 1997.

CATERINA, M. J., JULIUS, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annual Review of Neuroscience*, v. 24, p. 487-517, 2001.

CAVALCANTE, D. S. *O aumento da seletividade COX-2 influencia na modulação do edema de pata de rato induzido por carragenina?* 2007. 45 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

CERQUEIRA, M. B. S.; SOUZA, J. T.; AMADO JÚNIOR, R.; PEIXOTO, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto liofilizado do caule e folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). *Ciência e Cultura*, v. 39, n.5-6, p. 551-553, 1987.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 17, n. 6, p. 417-423, 2002.

CHIARI, E.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MESQUITA, A. A. L.; TAVARES, K. G. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene*, v. 85, n. 3, p. 372-374, 1991.

CHIARI, E.; PERRY, K. S. P.; SAÚDE, D. A.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; GRANDI, T. S. M.; STEHMANN, J. R.; ANJOS, A. M. G.; OLIVEIRA, A. B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research*, v. 10, n. 7, p. 636-638, 1996.

CHICARO, P.; PINTO, E.; COLEPICOLO, P.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Flavonoids from *Lychnophora passerina* (Asteraceae): potential antioxidants and UV-protectants. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 239-243, 2004.

CHIELI, E.; ROMITI, N. Kidney proximal human tubule HK-2 cell line as a tool for the investigation of P-glycoprotein modulation by natural compounds. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, v.7, n. 6, p. 281-295, 2008.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 2, p. 91-95, 2003.

CLAVÉ, P.; GUILLAUMES, S.; BLANCO, I.; NABAU, N.; MERCÉ, J.; FARRÉ, A.; MARRUECOS, L.; LLUÍS, F. Amylase, lipase, pancreatic isoamylase and phospholipase A in diagnosis of acute pancreatitis. *Clinical Chemistry*, v. 41, n. 8, p. 1129-1134, 1995.

COILE, N. C.; JONES JR, S. B. *Lychnophora* (Compositae: Vernonieae), a genus endemic to the Brazilian planalto. *Brittonia*, v. 33, n. 4, p. 528-542, 1981.

COLES, E. H. *Patologia clínica veterinária*. 3 ed., São Paulo: Manole, 1984, 566p.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE (BRASIL). Resolução nº 01, de 13 de junho de 1988. Dispõe sobre a aprovação das normas de pesquisa em saúde. *Diário Oficial de União*, 14 de junho de 1988.

CONTRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; LOPES, R. A.; CONTRERA, M. G. D. Ação da tintura-mãe de *Lychnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago*

microglossa, em feridas cutâneas de ratos. Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, v. 11, p. 157-160, 1985.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional Biochemistry, v. 7, p. 66-76, 1996.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 854, p. 435-442, 1998.

CROTEAU, R.; JOHNSON, M. A. Biosynthesis of terpenoids in glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P. L.; MEHTA, I. (Eds.) Biology and chemistry of plant trichomes. New York: Plenum Press, 1984, p. 133-185.

CROTTI, A. E. M.; CUNHA, W. R.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Sesquiterpene lactones from *Minasia alpestris*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 3B, p. 677-680, 2005.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, C. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. British Journal of Pharmacology, v. 42, n. 3, p. 392-402, 1971.

CRYER, B.; FELDMAN, M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. The American Journal of Medicine, v. 104, n. 5, p. 413-421, 1998.

CUNHA, W. R. *Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de Lychonophora rupestris SEMIR & LEITÃO FILHO (Vernoniae, Compositae)*. 1994. 166 f. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1994.

DAI, K-S.; TAI, D-Y.; HO, P.; CHEN, C-C.; PENG, W-C.; CHEN, S-T.; HSU, C-C.; LIU, Y-P.; HSIEH, H-C.; MAO, S. J. T. An evaluation of clinical accuracy of the EasyTouch blood uric acid self-monitoring system. Clinical Biochemistry, v. 38, p. 278-281, 2005.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E. A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. Pharmacology, v. 22, n. 2, p. 113-127, 1981.

DELGADO, G.; OLIVARES, M. S.; CHÁVEZ, M. I.; RAMÍREZ-APAN, T.; LINARES, E.; BYE, R.; ESPINOSA-GARCÍA, F. Anti-inflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. Journal of Natural Products, v. 64, n. 7, p. 861-864, 2001.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. Agents and Actions, v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sciences, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

- DICKENSON, A.; BESSON, J. M. The Pharmacology of Pain. Berlin: Springer, 1997.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. The Journal of Pathology, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971a.
- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. The Journal of pharmacy and pharmacology, v. 23, n. 4, p. 297-298, 1971b.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. The Journal of pharmacy and pharmacology, v. 24, n. 2, p. 89-102, 1972.
- DORETTO, J. S. *Influência do tempo e da temperatura de armazenagem sobre a estabilidade de alguns constituintes do soro sangüíneo de bovinos*. 1996. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.
- DUARTE, D. S. *Estudo Químico Biológico de Lychnophora pinaster Mart.* 1993. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- DUARTE, D. S. *Estudo químico biomonitorado de Lychnophora pinaster Mart. (Asteraceae) e de Macfadyena unguis-cati (L.) A Gentry (Bignoniaceae)*. 1999. 177 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.
- DUFOUR, D. R.; LOTT, J. A.; NOLTE, F. S.; GRETCH, D. R.; KOFF, R. S.; SEEFF, L. B. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. Clinical Chemistry, v. 46, n. 12, p. 2027-2049, 2000.
- EDDY, N. B.; TOUCHBERRY, C. F.; LIEBERMAN, J. E. Synthetic analgesics I. Methadone isomers and derivatives. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 98, n. 2, p. 121-137, 1950.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 107, p. 385-393, 1953.
- ESCRIBANO, E.; CALPENA, A. C.; QUERALT, J.; OBACH, R.; DOMÉNECH, J. Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 19, p. 203-210, 2003.
- ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIE, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. Journal of Ethnopharmacology, v. 101, p. 191-196, 2005.
- FAHN, A. Estructural and functional properties of trichomes of xeromorphhic leaves. Annals de Botanica, v. 57, p. 631-637, 1986.

FARNSWORTH, N. R. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 55, n. 3, p. 225-276, 1966.

FARNSWORTH, N. R. Testando plantas para novos remédios. In: E.O. Wilson (Ed.), *Biodiversidade*. Rio de Janeiro, Editora Nova Fronteira, 1997, p. 107-125.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, v. 2, p. 12-26, 1997.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. *European Journal of Cancer Prevention*, v. 8, n. 1, p. 17-25, 1999.

FERRARI, F. C. *Estudo fitoquímico da fração acetato de etila e avaliação da atividade anti-inflamatória in vitro e in vivo e da toxicidade em camundongos de *Lychnophora trichocarpha* Spreng.* 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

FERRAZ-FILHA, Z. S. *Avaliação das atividades biológicas de espécies do gênero *Lychnophora* (arnicas) e estudo fitoquímico do extrato ativo de *Lychnophora staavioides* Mart.* 2008. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2008.

FERRAZ FILHA, Z. S.; VITOLO, I. F.; FIETTO, L. G.; LOMBARDI, J. A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Xanthine oxidase inhibitory activity of *Lychnophora* species from Brazil ("Arnica"). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 79-82, 2006.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. *International Journal of Clinical Practice. Supplement*, v. 128, p. 2-10, 2002.

FERREIRA, S. H. Entre a compreensão e a confusão: alodínia e hiperalgesia. Dor on line Disponível em <<http://www.dol.inf.br/Html/EditoriaisAnteriores/Editorial31.html>> 2002a. Acesso em 02/10/09.

FERREIRA, A. A.; AZEVEDO, A. O.; SILVEIRA, D.; OLIVEIRA, P. M.; CASTRO, M. S. A.; RASLAN, D. S. Constituents of *Lychnophora pinaster* hydroalcoholic extract. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 41, n. 4, p. 466, 2005.

FILIPPIN, F. B.; REIS, K.; CEMIN, L.; DUZZIONI, M.; HERMES, E. M.; SOUZA, L. C. Novo intervalo de referência para alanina aminotransferase usando o sistema automatizado de bioquímica Dade Behring Ar Dimension. *NewsLab*, ed. 65, p. 148-160, 2004.

FINCO, D. R. Kidney function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.) *Clinical biochemistry of domestic animals*. California: Academic Press, 1997, cap. 17, p. 441-484.

FISHER, N. H. Sesquiterpenoid lactones. In: CHARLWOOD, B. V.; BANTHORPE, D. V. (Eds.) *Methods in plant biochemistry: Terpenoids*, London: Academic Press, v. 7, p. 187-211, 1991.

FLAUSINO, D.; LOPES, N. P. Estudo das variações sazonal e circadiana dos metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides*. In: 8º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Livro de Resumos, v. 1, p. 370, 2000.

FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation: a fat chance? *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 5, p. 671-674, 2005.

FRANCOIS, G.; PASSREITER, C. M.; WOERDENBAG, H. J.; VAN LOOVEREN, M. Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Médica*, v. 62, n. 2, p. 126-129, 1996.

FRANGOIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, v. 53, n. 1, p. 31-47, 2002.

FRANKE, R.; SCHILCHER, H. *Chamomile Industrial Profiles: Medical and Aromatic Plants*, v. 42. Flórida: Taylor & Francis, 2005, 289 p.

FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Ministério da Saúde - Núcleo Nacional de Economia da Saúde, Brasília, 15p., 2007.

FUNDYTUS, M. E. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs*, v. 15, n. 1, p. 29-58, 2001.

GÀBOR, M. *Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications*. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GALBRAITH, J. A.; MROSKO, B. J.; MYERS, R. R. A system to measure thermal nociception. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 49, n. 1-2, p. 63-68, 1993.

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S.; ESTELLER, A.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 557, n. 2-3, p. 221-229, 2007.

GARCÍA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORA, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF- κ B plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 43, p. 39713-39720, 2001.

GEETHA T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia*, v. 69, p. 13-19, 1998.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 77-80, 2001.

- GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Canadian Medical Association Journal*, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.
- GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. C.; NASSIS, C. Z.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, J. L. C.; RODRIGUES, D. C.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M. T. T.; DIAS, D. A.; LOPES, J. N. C. Antimicrobial activity of sesquiterpenes lactones. *Química Nova*, v. 13, n. 4, p. 312-314, 1990.
- GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R. Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: HEYER W. R.; VANZOLINI, P. E. (Eds.) *Proceedings of a workshop on Neotropical Distribution Patterns*, Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1988, p. 39-69.
- GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). *Planta Médica*, v. 71, p. 3-6, 2005.
- GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; ALBARELLA, L.; ZOLLO, F.; PIZZA, C.; LOPES, N. P. Glycosides, caffeoylquinic acids and flavonoids from the polar extract of leaves of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 36, p. 473-475, 2008.
- GOMES, E. C.; ELPO, E. R. S.; GABRIEL, M. M.; LOPES, M. Plantas medicinais com características tóxicas usadas pela população do município de Morretes, PR. *Revista Visão Acadêmica*, v. 2, n. 2, p. 77-80, 2001.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 198 p.
- GOOGRICH, B. F. Carbopol - High performance polymers for pharmaceuticals. *Bulletin*, v. 14, p. 24, 1997.
- GOULD, T. D.; DAO, D. T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. Mood and Anxiety Relates Phenotypes in Mice, v. 42, n. 1, p. 1-20, 2009.
- GOZZANI, J. L. Opióides e antagonistas. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 44, n. 1, p. 65-73, 1994.
- GRABLEY, S.; THIERICKE, R. Bioactive agents from natural sources: trends in discovery and application. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, v. 64, p. 101-154, 1999.
- GRAEL, C. F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G. E.; LOPES, J. L.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W. R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. *Phytotherapy Research*, v. 14, n. 3, p. 203-206, 2000.

GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and of isolated compounds. *Fitoterapia*, v. 76, p. 73-82, 2005.

GREAVES, P. *Histopathology of preclinical toxicity studies: interpretation and relevance in drug safety evaluation*, 3rd ed., San Diego: Academic Press, 2007, 960 p.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento. Parte I: Biodiversidade e matérias-primas farmacêuticas*. 5 ed. rev. e ampl., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004, cap. 1, p. 14-16.

GUY, R. H.; HADGRAFT, J. Transdermal drug delivery: the ground rules are emerging. *Pharmacy International*, v. 6, n. 5, p. 112-116, 1985.

GUZZO, L. S. *Avaliação de atividades farmacológicas de diferentes espécies de Lychnophora utilizadas pela população*. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; SILVA, A. C. A.; LOMBARDI, J. A.; GUIMARÃES, H. N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, n. 1, p. 120-124, 2008.

GWAK, H. S.; CHUN, I. K. Effect of vehicles and penetration enhancers on the *in vitro* percutaneous absorption of tenoxicam through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 236, n. 1-2, p. 57-64, 2002.

HALL, C. S. Temperament: a survey of animal studies. *Psychological Bulletin*, v. 38, n. 10, p. 909-943, 1941.

HALL, I. H.; LEE, K. H.; STARNES, C. O.; SUMIDA, Y.; WU, R. Y.; WADDELL, T. G.; COCHRAN, J. W.; GERHART, K. G. Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68, n. 5, p. 537-542, 1979.

HALL, I. H.; STARNES, C. O.; LEE, K. H.; WADDELL, T. G. Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 69, n. 5, p. 537-543, 1980.

HANDWERKER, H. O. Assessment of experimentally induced pain: old and new methods. *The American Journal of Medicine*, v. 75, n. 5, p. 15-18, 1983.

HARBORNE, J. F.; WILLIAMS, C. A.; VERNONIEAE, C. A. In: HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. (Eds.). *The biology and chemistry of the compositae*. London: Academic Press, 1977, 523p.

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

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 161, p. 117-119, 2000.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw edema: A new model for inflammation? *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 20, p. 243-249, 1987.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 298, p. 3-16, 1991.

HOSKIN, P J.; HANKS, G. W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. *Drugs*, v. 41, n. 3, p. 326-344, 1991.

HUANG, M. T.; LYSZ, T.; FERRARA, T.; ABIDI, T. F.; LASKIN, J. D.; CONNEY, A. H. Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis. *Cancer Research*, v. 51, n. 3, p. 813-819, 1991.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O. G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behavioural Brain Research*, v. 21, n. 2, p. 101-108, 1986.

INUI, K. I.; MASUDA, S.; SAITO, H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney International*, v. 58, p. 944-958, 2000.

IVERSEN, P. O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening*, v. 123, n. 23, p. 3402-3405, 2003.

JAHN, A. I.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 2-3, p. 171-178, 1997.

JAIPETCH, T.; KANGHAE, S.; PANCHAROEN, O.; PATRICK, V. A.; REUTRAKUL, V.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; WHITE, A. H. Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*) isolation, crystal structure and synthesis of (+/-)-boesenbergin A. *Australian Journal of Chemistry*, v. 35, p. 351-361, 1982.

JANSSEN, P. A. J.; NIEMEGEREERS, C. J. E.; DONY, J. G. H. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittel-Forschung*, v. 13, p. 502-507, 1963.

JISAKA, M.; KAWANAKA, M.; SUGIYAMA, H.; TAKEGAWA, K.; HUFFMAN, M. A.; OHIGASHI, H.; KOSHIZU, K. Antischistosomal activities of sesquiterpene lactones and steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, possibly used by wild chimpanzees against

parasite-related diseases. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 56, p. 845-846, 1992.

JMELNITZKY, A. C.; GUIDI, M.; BOLOGNA, A.; VIOLA, M.; SOCCINI, C.; BARBERO, R.; BELLONI, P.; APRAIZ, M. Clinic-epidemiological significance of drug hepatotoxicity in liver disease consultation. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, v. 30, n. 2, p. 77-84, 2000.

JONES, S. L. Anatomy of pain. In: SINATRA, R. S.; HORD, A. H.; GINSBERG, B.; PREBLE, L. M. (Eds.). *Acute Pain: Mechanisms & Management*. St. Louis: Mosby-Year Book, 1992, cap. 2, p. 8-28.

JORDÃO, C.O.; LOPES, J. L. C.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Biological activity of the crude extracts and isolated substances from *Lychnophora salicifolia* Mart. In: 1st Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto, *Bolletino Chimico Farmaceutico*, v. 136, p. 56, 1997.

JORDÃO, C. O.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P.; Lopes, J. L. C. Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de *Lychnophora gardneri* Schultz-Bip. In: 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, Livro de Resumos, v. 2, p. 59, 2000.

JORDÃO, C. O. *Estudo fitoquímico e ensaios biológicos de Lychnophora gardneri Schultz-Bip*. 2003. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

JORDÃO, C. O.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G. E.; ALBUQUERQUE, S.; CALLEGARI LOPES, J. L. Trypanocidal activity of chemical constituents from *Lychnophora salicifolia* Mart. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 4, p. 332-334, 2004.

JUBERG, D. R.; MUDRA, D. R.; HAZELTON, G. A.; PARKINSON, A. The effect of fenbuconazole on cell proliferation and enzyme induction in the liver of female CD1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 214, n. 2, p. 178-187, 2006.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

KALLAI, L.; HAHN, A.; RODER, V.; ZUPANIC, V. Correlation between histological findings and serum transaminase values in chronic diseases of the liver. *Acta Medica Scandinavica*, v. 175, n. 1, p. 49-56, 1964.

KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Inhibitory activity of flavonoids from *Lychnophora* sp. on generation of reactive oxygen species by neutrophils upon stimulation by immune complexes. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 1, p. 61-65, 2004.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5. ed., San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

- KAPLAN, M. M. Alanine aminotransferase levels: what's normal? *Annals of Internal Medicine*, v. 137, n. 1, p. 49-51, 2002.
- KARIN, M.; DELHASE, M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. *Seminars in Immunology*, v. 12, p. 85-98, 2000.
- KATAYAMA, M.; McANULTY, J. F. Renal transplantation in cats: techniques, complications, and immunosuppression. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 24, n. 11, p. 874-882, 2002.
- KAUR, R.; SINGH, D.; CHOPRA, K. Participation of α_2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *Journal of Medicinal Food*, v. 8, n. 4, p. 529-532, 2005.
- KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis*, v. 135, n. 1, p. 93-102, 1997.
- KESSLER, R. C.; DAVIS, R. B.; FOSTER, D. F.; VAN ROMPAY, M. I.; WALTERS, E. E.; WILKEY, S. A.; KAPTCHUK, T. J.; EISENBERG, D. M. Long-term trends in the use of complementary and alternative medical therapies in the United States. *Annals of Internal Medicine*, v. 135, n. 4, p. 262-268, 2001.
- KEW, M. C. Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage. *The Lancet*, v. 355, p. 591-592, 2000.
- KIM, B. J.; KIM, J. A.; HEO, M. Y.; KIM, H. P. Antioxidant and anti-inflammatory activities of the mung bean: Activity and inhibition of inflammatory and allergic responses, *Cosmetics and Toiletries*, v. 113, p. 71-74, 1998.
- KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. Y.; KIM, H. P. Effects of Naturally Occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, v. 58, n. 5, p. 759-765, 1999.
- KIMURA, Y.; OKUDA, H.; OKUDA, T.; HATANO, T.; AGATA, I.; ARICHI, S. Studies on the activities of tannins and related compounds. V. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Planta Médica*, v. 50, n. 6, p. 473-477, 1984.
- KLASS, C. A.; WAGNER, G.; LAUFER, S.; SOSA, S.; LOGGIA, R. D.; BOMME, U.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceutics prepared from Arnica flowers. *Planta Medica*, v. 68, p. 385-391, 2002.
- KOETER, H. B. Test guideline development and animal welfare: regulatory acceptance of *in vitro* studies. *Reproductive Toxicology*, v. 7, suppl. 1, p. 117-123, 1993.
- KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*, v. 113, p. 427-437, 2004.

KUPCHAN, S. M.; FESSLER, D. C.; EAKIN, M. A.; GIACOBBE, T. J. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science*, v. 168, n. 3929, p. 376-377, 1970.

KUPCHAN, S. M.; EAKIN, M. A.; THOMAS, A. M. Tumor inhibitors. 69. Structure-citotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 12, p. 1147-1152, 1971.

LANG, G.; PASSREITER, C. M.; WRIGHT, C. W.; FILIPOWICZ, N. H.; ADDAE-KYEREME, J.; MEDINILLA, B. E.; CASTILLO, J. J. Antiplasmodial activities of sesquiterpene lactones from *Eupatorium semialatum*. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*, Tubingen, p. 283-286, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento. Parte I: Biodiversidade e matérias-primas farmacêuticas*, 6 ed., Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2007, cap. 11, p. 248-250.

LARANJINHA, J. A. N.; ALMEIDA, L. M.; MADEIRA, V. M. C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, v. 48, n. 3, p. 487-494, 1994.

LARANJINHA, J.; VIEIRA, O.; ALMEIDA, L.; MADEIRA, V. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂ dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. *Biochemical Pharmacology*, v. 51, n. 4, p. 395-402, 1996.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S. B.; CALIXTO, J. B.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 462, n. 1-3, p. 185-192, 2003.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S. B.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A. A novel hot-plate test sensitive to hyperalgesic stimuli and non-opioid analgesics. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, n. 3, p. 445-451, 2005.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C. A. Peripheral actions of tachykinins. *Neuropeptides*, v. 34, n. 5, p. 303-313, 2000.

LEE, K. H.; HALL, I. H.; MARC, E. C.; STARNES, C. O.; ELGEBALY, S. A.; WADDELL, T. G.; HADGRAFT, R. I.; RUFFNER, C. G.; WEIDNER, I. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. *Science*, v. 196, p. 533-536, 1977.

LEITÃO FILHO, H. F.; SEMIR, J. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 2, p. 113, 1979.

- LEMES, A. S.; BRACCINI, M. C. Descrição e análise histológica das glândulas anexas do trato digestório de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE). Biodiversidade Pampeana, v. 2, p. 33-41, 2004.
- LE QUESNE, P. W.; PASTORE, M. P.; RAFFAUF, R. F. The cytotoxic flavonoids of *Lychnophora affinis*. Lloydia, v. 36, p. 391-394, 1976.
- LEY, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. Immunological Reviews, v. 186, n. 1, p. 8-18, 2002.
- LOPES, N. P. A essência da arnica. Rev. Fapesp Pesquisa, v. 64, p. 42-44, 2001.
- LUMSDEN, J. H.; JACOBS, R. M. Clinical chemistry: in-clinic analysis, quality control, reference values, and system selection. The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v. 19, n. 5, p. 875-897, 1989.
- LYß, G.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF- κ B by directly targeting p65. The Journal of Biological Chemistry, v. 273, n. 50, p. 33508-33516, 1998.
- LYSS, G.; KNORRE, A.; SCHMIDT, T. J.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-kappa B. Biological Chemistry, v. 378, n. 9, p. 951-961, 1997.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Verlag, Berlim, 1970.
- 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.* 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- MACIEL, R. L.; MOREIRA-CAMPOS, L. M.; SILVA, B. C.; BRANDÃO, M. G. L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 1, p. 99-104, 2006.
- MANSUR, J.; MARTZ, R. M. W.; CARLINI, E. A. Effects of acute and chronic administration of cannabis sativa and (-) 9-trans tetrahydrocannabinol on the behaviour of rats in open field arena. Psychopharmacology, v. 19, p. 338-397, 1971.
- MARINI-BETOLLO, G. B.; NICLETTI, M.; PATAMIA, M.; GALEFFI, G.; MESSANA, I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. Journal of Chromatography A, v. 213, n. 1, p. 113-127, 1981.

MARQUARDT, D.; SUCKER, H. Oil-in-water-emulsion gels: determination and mathematical treatment of flow properties. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 46, n. 1, p. 115-124, 1998.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, B.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; TUÑÓN, M. J. Quercetin attenuates nuclear factor- κ B activation and nitric oxide production in interleukin-1 β -activated rat hepatocytes. *The Journal of Nutrition*, v. 135, n. 6, p. 1359-1365, 2005.

MAXIE, M. G.; NEWMAN, S. J. Urinary system. In: MAXIE, M. (Ed.), JUBB, KENNEDY & PALMER's *Pathology of domestic animals*, v. 2, Edinburgh: Saunders Elsevier, 2007, p. 425-522.

MAZOR, R. L.; MENENDEZ, I. Y.; RYAN, M. A.; FIEDLER, M. A.; WONG, H. R. Sesquiterpene lactones are potent inhibitors of interleukin 8 gene expression in cultured human respiratory epithelium. *Cytokine*, v. 12, n. 3, p. 239-245, 2000.

McKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, v. 20, n. 7, p. 519-530, 2006.

MELO, L. Q. *Estratégias para Conservação ex situ de Arnica (Lychnophora ericoides Less)*. 2006. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MENDES, A. Avaliação em larga escala do diclofenaco colestiramina em lesões traumáticas agudas. *Revista Brasileira de Medicina*, v. 58, n. 4, p. 249-256, 2001.

MENDES, C. L. A. Triterpenóides e a sua actividade anti-inflamatória. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa, p. 1-8, 2004. Disponível em <http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Carlos%20Leonardo%20TRABALHO.pdf>. Acesso em 21/07/09.

MERFORT, I. Arnica: New Insights on the Molecular Mode of Action of a Traditional Medicinal Plant. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, v. 10, suppl. 1, p. 45-48, 2003.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MIGUEL, O. G.; LIMA, E. O.; MORAIS, V. M. F.; GOMES, S. T. A.; DELLE MONACHE, F.; BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, v. 10, p. 694-696, 1996.

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

MILLAN, M. J. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, v. 66, p. 355-474, 2002.

MILLER, T. A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 245, n. 5, p. 601-623, 1983.

MILLER, O.; GONÇALVES, R. R. *Laboratório para o clínico*. 8. ed. São Paulo: Ateneu, 1995, 120 p.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, v. 55, n. 6, p. 441-449, 1996.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, n. 4, p. 254-260, 1955.

MORALES, A. I.; VICENTE-SÁNCHEZ, C.; JERKIC, M.; SANTIAGO, J. M.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P. D.; PÉREZ-BARRIOCANAL, F.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 210, n. 1-2, p. 128-135, 2006.

MORGAN, R. *Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: Doenças, Aplicações, Descrição e Propriedades*. 9 ed., São Paulo: Hemus, 2003.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, p. 115-121, 2003.

MOTTA, V. T. *Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações*. 4. ed., Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS - Caxias do Sul, 2003, 419 p.

MURRAY, M. Drug-mediated inactivation of cytochrome P450. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 24, n. 7, p. 465-470, 1997.

MURRAY, M. Altered CYP expression and function in response to dietary factors: potential roles in disease pathogenesis. *Current drug metabolism*, v. 7, n. 1, p. 67-81, 2006.

NAIDU, P. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. D₂-dopamine receptor and alpha 2-adrenoreceptor-mediated analgesic response of quercetin. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 41, n. 12, p. 1400-1404, 2003.

NARDINI, M.; PISU, P.; GENTILI, V.; NATELLA, F.; Di FELICE, M.; PICCOLELLA, E.; SCACCINI, C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress in U937. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 25, n. 9, p. 1098-1105, 1998.

NASCIMENTO, A. P. Hormônios locais, inflamação e reações imunológicas. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Eds.) Farmacologia. Seção 2: Mediadores químicos. 6. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap. 13, p. 202.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. Nature - insight review articles, v. 420, n. 19-26, p. 846-852, 2002.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). Food Chemistry. 3 ed., New York : Marcel Dekker, 1985, p. 226-314.

NEWMAN, J. D.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Journal of Natural Products, v. 70, p. 461-467, 2007.

NOVAS, M. L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J. H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, v. 30, n. 2, p. 331-336, 1988.

NUNES E.; OLIVEIRA, S. C.; MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. Open Journal Systems, v. 1, n. 6, 2006. Disponível em: <<http://www.fes.br/revistas/agora/ojs/viewarticle.php?id=43&layout=abstract>> Acesso em 11/11/09.

O'CALLAGHAN, J. P.; HOLTZMAN, S. G. Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 192, n. 3, p. 497-505, 1975.

OHNISHI, M.; MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; TODA, S.; SHIRATAKI, Y.; KIMURA, M.; KIDO, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. Phytochemistry, v. 36, n. 3, p. 579-583, 1994.

OLIVEIRA, A. B.; SAÚDE, D. A.; PERRY, K. S. P.; DUARTE, D. S.; RASLAN, D. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. Phytotherapy research, v. 10, p. 292-295, 1996.

OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. Pharmacological Research, v. 49, n. 2, p. 105-111, 2004.

OLIVEIRA, F. A. *Estudo das propriedades farmacológicas da resina de Protium heptaphyllum (Aubl) March e de seus principais constituintes, mistura de α e β -amirina.* 2005. 237 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA, R. C. P. J.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral

nociceptive pain by alpha- and betaamyryn, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. Life Sciences, v. 77, n. 23, p. 2942-2952, 2005a.

OLSEN, S.; SOLEZ, K. Acute tubular necrosis and toxic renal injury. In: TISHER, C. C.; BRENNER, B. M. (Eds.). Renal Pathology: with clinical and functional correlations, 2nd ed, Philadelphia: Lippincott Company, 1994, p. 769-809.

OMS - Organização Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, WHO/EDM/TRM/2002.1

OSORIO, R. M.; HEFTI, A.; VERTUCCI, F. J.; SHAWLEY, A. L. Cytotoxicity of endodontic materials. Journal of Endodontics, v. 24, n. 2, p. 91-96, 1998.

OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R. S.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of mixture of α -amyryn and β -amyryn triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 313, n. 1, p. 310-18, 2005.

OZTURK, Y.; AYDINI, S.; BEIS, R.; BASER, K. H. C.; BERBEROGLU, H. Effect of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum calximun* L. extract on the central nervous system in mice. Phytomedicine, v. 3, n. 2, p. 139-146, 1996.

PAIVA, F. P.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

PANTHONG, A.; KANJANAPOTHI, D.; TUNTIWACHWUTTIKUL, P.; PANCHAROEN, O.; REUTRAKUL, V. Antiinflammatory activity of flavonoids. Phytomedicine, v. 1, p. 141-144, 1994.

PARADA, C. A.; YEH, J. J.; REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Transient attenuation of protein kinase C ϵ can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. Neuroscience, v. 120, n. 1, p. 219-226, 2003.

PATTERSON, C. E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. Endothelium, v. 8, n. 2, p. 75-105, 2001.

PEREIRA, H. L. A.; RIBEIRO, S. L. E.; CICONELLI, R. M. Tratamento com antiinflamatórios tópicos na osteoartrite de joelho. Revista Brasileira de Reumatologia, v. 46, n. 3, p. 188-193, 2006.

PEREZ, R. M. G.; PEREZ, J. A. L.; GARCIA, L. M. D.; SOSSA, H. M. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. Journal of Ethnopharmacology, v. 62, p. 43-48, 1998.

PEREZ, R. R.; LOBO E SILVA, M. A. M.; VARZIM, F. L. S. B.; OLIVEIRA, S. B.; HUCKE, E. E. T. S. A ação do decanoato de nandrolona (Deca-durabolin®) sobre parâmetros

hematológicos e proteína total plasmática de ratos (*Rattus rattus*) com depressão medular induzida após administração de sulfato de vincristina (Oncovin®). *Ciência Rural*, v. 35, n. 2, p. 589-595, 2005.

PERIANAYAGAM, J. B.; SHARMA, S. J.; PILLAI, K. K. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extract in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, n. 3, p. 410-414, 2006.

PETERSEN-ZEITZ, K. R.; BASBAUM, A. I. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain*, v. 82, suppl.1, p. 5-12, 1999.

PICMAN, A. K.; RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. Formation of adducts of parthenin and related sesquiterpene lactones with cysteine and glutathione. *Chemico-Biological Interactions*, v. 28, n. 1, p. 83-89, 1979.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 14, n. 3, p. 225-281, 1986.

PIEPER-BIGELOW, C.; STROCCHI, A.; LEVITT, M. D. Where does serum amylase come from and where does it go? *Gastroenterology Clinics of North America*, v.19, n. 4, p. 793-810, 1990.

PINHEIRO, R. C. *Abordagem fitoquímica, rendimento do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. utilizando dois métodos de secagem*. 2002. 41 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobiotecnologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

PISONI, R.; RUGGENENTI, P.; REMUZZI, G. Drug-induced thrombotic microangiopathy: incidence, prevention and management. *Drug Safety*, v. 24, n. 7, p. 491-501, 2001.

PLAYFOR, S.; JENKINS, I.; BOYLES, C.; CHOONARA, I.; DAVIES, G.; HAYWOOD, T.; HINSON, G.; MAYER, A.; MORTON, N.; RALPH, T.; WOLF, A. Consensus guidelines on sedation and analgesia in critically ill children. *Intensive Care Medicine*, v. 32, n. 8, p. 1125-1136, 2006.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 71, n. 3, p. 313-324, 1996.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 331-338, 2004.

PRABHAKAR, M. C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M. A.; KHAN, S. Y. Pharmacological Investigations on Vitexin. *Planta Médica*, v. 43, n. 12, p. 396-403, 1981.

- PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.
- PU, X. C.; WONG, P. T. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*, v. 33, n. 11, p. 1425-1431, 1995.
- PULLA REDDY, A. C.; LOKESH, B. R. Studies on spice principles as antioxidants in the inhibition of lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 111, n. 1-2, p. 117-124, 1992.
- RANSON, J. H. Diagnostics standards for acute pancreatitis. *World Journal of Surgery*, v. 21, n. 2, p. 132-142, 1997.
- RAO, Y. K.; FANG, S-H.; TZENG, Y-M. Inhibitory Effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF- α and IL-12 in activated macrophages. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 5, p. 912-915, 2005.
- RASKIN, I.; RIBNICKY, D. M.; KOMARNYLSKY, S.; LLIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D. A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J. M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology*, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.
- RATTANATHONGKOM, A.; LEE, J. B.; HAYASHI, K.; SRIPANIDKULCHAI, B. O.; KANCHANAPOOM, T.; HAYASHI, T. Evaluation of chikusetsusaponin IVa isolated from *Alternanthera philoxeroides* for its potency against viral replication. *Planta Médica*, v. 75, n. 8, p. 829-835, 2009.
- RAUBER, C.; MELLO, F. B.; MELLO, J. R. B. Avaliação toxicológica pré-clínica do fitoterápico contendo *Aristolochia cymbifera*, *Plantago major*, *Luehea grandiflora*, *Myrocarpus frondosus*, *Piptadenia colubrina* (Cassaú Composto®) em ratos Wistar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, n. 1, p. 15-21, 2006.
- RAZA, M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of *Swiss* albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.
- REBAR, A. H.; FELDMAN, B. F. Guia de hematologia para cães e gatos. 1 ed. São Paulo: Roca, 2003, p. 77-79.
- REBECCA, M. A.; ISHII-IWAMOTO, E. L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R. K. N.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 83, n. 1-2, p. 101-104, 2002.

RENDIC, S.; DI CARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. *Drug Metabolism Reviews*, v. 29, n. 1-2, p. 413-580, 1997.

ROBERT, A.; HANCHAR, A. J.; LANCASTER, C.; NEZAMIS, J. E. Prostacyclin inhibits enteropooling and diarrhea. In: VANE, J. R.; BERGSTRÖM, S. (Eds.). *Prostacyclin*. New York: Raven Press, 1979, p. 147-158.

ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésicos, antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds.). *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed., Rio de Janeiro: MacGRAW-HILL, 2005, cap. 27, p. 518.

ROBINSON, H. E. Generic and subtribal classification of American Vernoniae. *Smithsonian contributions botany*, v. 89, Smithsonian Institution Press. Washington, DC, USA, 116p, 1999.

ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, v. 61, n. 3, p. 199-203, 1995.

RODRÍGUEZ, M.; SOSA, J.; HERNANDEZ, G.; MAS, M. Pineal indols and testosterone affect exploratory activity of male rats. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 40, n. 4, p. 397-398, 1984.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. *Plantas medicinais no domínio dos cerrados*. Lavras: UFLA, 180 p. 2001.

RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 292, n. 4, p. 869-873, 2002.

ROTH, I. Leaf structure: montane regions of Venezuela with an excursion into Argentina. In: *Encyclopedia of Plant Anatomy*, Berlin: Gebrüder Borntraeger, v. 14, part. 3, 1995, 249 p.

RUDZIK, A. D.; HESTER, J. B.; TANG, A. H.; STAW, R. N.; FRIIS, W. *The Benzodiazepines*. New York: Raven press, p. 285-297, 1973.

RÜNGELER, P.; CASTRO, V.; MORA, G.; GÖREN, N.; VICHNEWSKI, W.; PAHL, H. L.; MERFORT, I.; SCHMIDT, T. J. Inhibition of transcription factor NF- κ B by sesquiterpene lactones: a proposed molecular mechanism of action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 2343-2352, 1999.

RYLSKI, M.; DURIASZ-ROWINSKA, H.; REWERSKI, W. The analgesic action of some flavonoids in the hot plate test. *Acta Physiologica Polonica*, v. 30, n. 3, p. 385-388, 1979.

SACHS, B. D. The development of grooming and its expression in adult animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 525, p. 1-17, 1988.

- SAFAYHI, H.; SAILER, E. R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Médica*, v. 63, n. 6, p. 487-493, 1997.
- SAKAKIBARA, M.; DIFEO JR, D.; NAKATANI, N.; TIMMERMANN, B.; MABRY, T. J. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. Divaricata*. *Phytochemistry*, v. 15, n. 5, p. 727-731, 1976.
- SAKAMOTO, H. T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E. E.; STARK, C. B. W.; GATES, P. J.; LOPES, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 5, p. 693-695, 2003.
- SAKURADA, T.; MATSUMURA, T.; MORIYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO, S.; SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 75, n. 1, p. 115-121, 2003.
- SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuroscience Letters*, v. 235, n. 1-2, p. 73-76, 1997.
- SANTOS, A. R. S.; VEDANA, E. M. A.; FREITAS, G. A. G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflammation Research*, v. 47, n. 7, p. 302-307, 1998.
- SANTOS, P. A. *Análise química de calos de Lychnophora ericoides*. 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- SANTOS, M. D.; GOBBO NETO, L.; PIZZA, C.; LOPES, N. P. Estudos fitoquímicos do extrato polar das raízes de *Lychnophora ericoides* Mart. In: XVI Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Resumos. Recife, UFPE, 2001.
- SANTOS, P. A.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triterpenoids and flavonoids from *Lychnophoriopsis candelabrum* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 509-512, 2004.
- SANTOS, P. A.; AMARANTE, M. F. C.; PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B.; FRANÇA, S. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PEREIRA, M. R. P.; LOPES, N. P. Production of an antiproliferative furanoheliangolide by *Lychnophora ericoides* cell culture. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, n. 12, p. 1433-1435, 2004a.
- SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E .P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 96, p. 545-549, 2005.
- SANTOS, M. D. *Lychnophora ericoides* Mart: avaliação farmacológica e considerações sobre o metabolismo oxidativo das substâncias bioativas. 2006. 104 f. Tese (Doutorado em

Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SARDESAI, V. M. Herbal medicines: Poisons or potions? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 139, n. 6, p. 343-348, 2002.

SARTORI, F. T.; SACILOTTO, A. C. B. C.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; VICHNEWSKI, W. Phytochemical study of *Lychnophora markgravii* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 609-612, 2002.

SAÚDE, D. A.; RASLAN, D. S.; SOUZA FILHO, J. D.; OLIVEIRA, A. B. Constituents from the aerial parts of *Lychnophora trichocarpa*. *Fitoterapia*, v. LXIX, n. 1, p. 90-91, 1998.

SAÚDE, D. A.; BARRERO, A. F.; OLTRA, J. E.; JUSTICIA, J.; RASLAN, D. S.; SILVA, E. A. Atividade antibacteriana de furanoelíngólidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 7-10, 2002.

SCHENKEL, E. P.; SIMÕES, C. M. O.; MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; IRGAND, B. E.; STEHMANN, J. R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. *Caderno de Farmácia*, v. 1, n. 2, p. 67-72, 1985.

SCHMIDT, T. J. Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. In: *Current Organic Chemistry*, v. 3, n. 6, p. 577-608, 1999a.

SCHMIDT, T. J.; Lyß, G.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Helenanolide type sesquiterpene lactones. Part 5: The role of glutathione addition under physiological conditions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 12, p. 2849-2855, 1999.

SCHRÖDER, H.; LÖSCHE, W.; STROBACH, H.; LEVEN, W.; WILLUHN, G.; TILL, U.; SCHRÖR, K. Helenalin and 11- α , 13-dihydrohelenalin, two constituents from *Arnica montana* L., inhibit human platelet function via thiol-dependent pathways. *Thrombosis Research*, v. 57, n. 6, p. 839-845, 1990.

SCOTTI, M. T.; FERNANDES, M. B.; FERREIRA, M. J. P.; EMERENCIANO, V. P. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones with cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 2927-2934, 2007.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*, v. 48, n. 2, p. 121-595, 1982.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, v. 91, n. 25, p. 12013-12017, 1994.

SELLERS, R. S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of toxicologic pathology position paper: organ weight

recommendations for toxicology studies. *Toxicologic Pathology*, v. 35, n. 5, p. 751-755, 2007.

SEMIR, J. *Revisão taxonômica de Lychnophora Mart. (Vernoniaceae: Compositae)*. 1991. 515 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1991.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHEN, S. C.; LEE, W. R.; LIN, H. Y.; HUANG, H. C.; KO, C. H.; YANG, L. L.; CHEN, Y. C. *In vivo* and *in vitro* inhibitory activities of rutin, wogonin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E₂ production. *European Journal of Pharmacology*, v. 446, n. 1-3, p. 187-194, 2002.

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

SIEDLE, B.; GARCIA-PINERES, A. J.; MURILLO, R.; SCHULTE-MONTING, J.; CASTRO, V.; RUNGELER, P.; KLAAS, C. A.; DA COSTA, F. B.; KISIEL, W.; MERFORT, I. Quantitative structure-activity relationship of sesquiterpene lactones as inhibitors of the transcription factor NF- κ B. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 24, p. 6042-6054, 2004.

SILVA, S. M. P. *Aspectos da fenologia e da reprodução sexuada da arnica (Lychnophora pinaster Mart.) - Asteraceae*. 1994. 45 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1994.

SILVA, E. A. Atividade antibacteriana de furanoeliangólidos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, 2002.

SILVA, M. G.; DINIZ, M. F. F. M.; OLIVEIRA, R. A. G. *Fitoterápicos: Guia do Profissional de Saúde*. João Pessoa: Universitária, 2002a, 36p.

SILVEIRA, D.; WAGNER, H.; CHIARI, E.; LOMBARDI, J. A.; ASSUNÇÃO, A. C.; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS/FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ DE INFORMAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA/ Estatística Anual de Casos de Intoxicação e Envenenamento. Brasil, 2003. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>>. Acesso em 11/12/2009.

- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n. 1, p. 71-81, 2002.
- SOUSA, O. V.; OLIVEIRA, M. S.; CUNHA, R. O.; COSTA, B. L. S.; ZANCANELLA, C. R.; LEITE, M. N. Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 13, supl. 1, p. 30-34, 2003.
- SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. V. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.
- SRIDHAR, C.; KRISHNARAJU, A. V.; SUBBARAJU, G. V. Anti-inflammatory constituents of *Teramnus labialis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68, n. 1, p. 111-114, 2006.
- STICKEL, F.; PATSENKER, E.; SCHUPPAN, D. Herbal hepatotoxicity. *Journal of Hepatology*, v. 43, n. 5, p. 901-910, 2005.
- STOKES, W. S. Humane endpoints for laboratory animals used in regulatory testing. *ILAR Journal*, v. 43, suppl., p. 31-38, 2002.
- STRAND, R. D. O que seu médico não sabe sobre medicina nutricional pode estar matando você? 1 ed., São Paulo: M. Books do Brasil, 2004.
- STVRTINOVÁ, V.; JAKUBOVSKÝ, J.; HULÍN, I. Inflammation and Fever. In: *Pathophysiology: Principles of Diseases*. Academic Electronic Press, 1995. Disponível em <<http://nic.sav.sk/logos/books/scientific/Inffever.html>> Acesso em 23/09/09.
- SUBEHAN, T. U.; IWATA, H.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. Mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP2D6 by Indonesian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, n. 3, p. 449-455, 2006.
- ZAIDI-SUBEHAN, S. F. H.; KADOTA, S.; TEZUKA, Y. Inhibition on human liver cytochrome P450 3A4 by constituents of Fennel (*Foeniculum vulgare*): identification and characterization of a mechanism-based inactivator. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 25, p. 10162-10167, 2007.
- SUD'INA, G. F.; MIRZOEVA, O. K.; PUSHKAREVA, M. A.; KORSHUNOVA, G. A.; SUMBATYAN, N. V.; VARFOLOMEEV, S. D. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *Federation of European Biochemical Societies*, v. 329, n. 1-2, p. 21-24, 1993.
- SÜLEYMAN, H.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. The Effects of Newly Synthesized Pyrazole Derivatives on Formaldehyde-, Carrageenan-, and Dextran- Induced Acute Paw Edema in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 24, n. 10, p. 1133-1136, 2001.

SÜLEYMAN, H.; GUL, H. I.; ASOGLU, M. Anti-inflammatory activity of 3-benzoyl-1-methyl-4-phenyl-4-piperidinol hydrochloride. *Pharmacological Research*, v. 47, n. 6, p. 471-475, 2003.

SÜMEN, G.; CIMSIT, M.; EROGLU, L. Hyperbaric oxygen treatment reduces carrageenan-induced acute inflammation in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 431, n. 2, p. 265-268, 2001.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, n. 6, p. 881-900, 2003.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). *Advances in Pharmacology*, v. 24, p. 123-155, 1993.

TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A.; BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; MISSIO, T. P.; TEIXEIRA, M. V.; SINHORIN, A. P.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 10, p. 1531-1540, 2004.

TAKAYAMA, H.; ISHIKAWA, H.; KURIHARA, M.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; PONGLUX, D.; KOYAMA, F.; MATSUMOTO, K.; YAMAMOTO, L. T.; WATANABE, K.; MURAYAMA, T.; HORIE, S. Studies on the synthesis and opioid agonistic activities of mitragynine-related indole alkaloids: discovery of opioid agonists structurally different from other opioid ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 9, p. 1949-1956, 2002.

TAKEARA, R.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae Asteraceae). *Phytomedicine*, v. 10, p. 490-493, 2003.

TAN, P.; LUSCINSKAS, F. W.; HOMER-VANNIASINKAM, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, v. 17, n. 5, p. 373-389, 1999.

TAVARES, K. G. *Estudo químico de Lychnophora vilosissima (Compositae), Piper aduncum e Piper superba (Piperaceae)*. 1990. 164 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1990.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. A. 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TJØLSEN, A.; ROSLAND, J. H.; BERGE, O. G.; HOLE, K. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *Journal of Pharmacological Methods*, v. 25, n. 3, p. 241-250, 1991.

TOMINAGA, M.; CATERINA, M. J.; MALMBERG, A. B.; ROSEN, T. A.; GILBERT, H.; SKINNER, K.; RAUMANN, B. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, v. 21, n. 3, p. 531-543, 1998.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology*, v. 101, n. 4, p. 983-390, 2004.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. *Princípios de anatomia e fisiologia*, 9 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1047p.

TOWERS, G. H. N.; WAT, C. K.; GRAHAM, E. A.; BANDONI, R. J.; CHAN, G. F. Q.; MITCHELL, J. C.; LAM, J. Ultraviolet - mediated activity of species of Compositae caused by polyacetylenic compounds. *Lloydia*, v. 40, n. 5, p. 487-498, 1977.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. *Nature - insight review articles*, v. 420, n. 19-26, p. 853-859, 2002.

TRESCOT, A. M.; DATTA, S.; LEE, M.; HANSEN, H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*, v. 11, p. 133-153, 2008.

TULUNAY, F. C. NSAIDs: behind the mechanisms of action. *Functional Neurology*, v. 15, suppl. 3, p. 202-207, 2000.

TURNER, R. A. *Screening procedures in pharmacology*. Academic Press, New York, 99 p., 1972.

UHLIG, S.; WISLØFF, H.; PETERSEN, D. Identification of cytotoxic constituents of *Nartheicum ossifragum* using bioassay-guided fractionation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 15, p. 6018-6026, 2007.

VALÉRIO, D. A. R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; DA COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI JÚNIOR, W. A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology*, v. 562, p. 155-163, 2007.

VANDERLINDE, R. E. Review of pyridoxal phosphate and the transaminases in liver disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v. 16, n. 2, p. 79-93, 1986.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. *FASEB Journal*, v.1, p. 89-96, 1987.

VANE, J. R.; BOLTING, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflammation Research*, v. 44, n. 1, p. 1-10, 1995.

VAN THIEL, D. H.; CARACENI, P.; MOLLOY, P. J.; HASSANEIN, T.; KANIA, R. J.; GURAKAR, A.; FREIDLANDER, L. Chronic hepatitis C in patients with normal or near

normal alanine aminotransferase levels: the role of interferon α 2b therapy. *Journal of Hepatology*, v. 23, n. 5, p. 503-508, 1995.

VARGA, V. R. S. Fármacos anti-inflamatórios e imunossupressores. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Eds.) *Farmacologia. Seção 2: Mediadores químicos*. 6. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, cap. 14, p. 232-233

VAZQUEZ, E.; HERNANDEZ, N.; ESCOBAR, W.; VANEGAS, H. Antinociception induced by intravenous dipyrene (metamizol) upon dorsal horn neurons: Involvement of endogenous opioids at the periaqueductal gray matter, the nucleus raphe magnus, and the spinal cord in rats. *Brain Research*, v. 1048, n. 1-2, p. 211-217, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VICHNEWSKY, W.; SARTI, S. J.; GILBERT, B.; HERZ, W. Goyazensolide, a schistosomicidal heliangolide from *Eremanthus goyazensis*. *Phytochemistry*, v. 15, p. 191-193, 1976.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brasil. In: JANICK, J. (Ed.). *Perspectives on new crops and new uses*. Alexandria: ASHS Press, 1999, p. 152-159.

VIEIRA, R. F.; MARTINS M. V. M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: *Proc. Int. Savanna Symposium, Brasília, DF, Embrapa/CPAC*. p. 169-171, 1998.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.

VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, K. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in hind limb of the rat. *Federation Proceedings*, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, n. 11, p. 2800-2802, 1995.

VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*, v. 18, n. 6, p. 1067-1075, 1998.

VISSERS, R. J.; ABU-LABAN, R. B.; MCHUGH, D. F. Amylase and lipase in the emergency department evaluation of acute pancreatitis. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 17, n. 6, p. 1027-1037, 1999.

VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; MOSUGU, O.; CHINDO, B. A.; NGAZAL, I. E.; SALAWU, A. O.; KWANASHIE, H. O.; GAMANIEL, K. S. Antinociceptive profile of the

methanolic extract of *Neorautanenia mitis* root in rats and mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 92, n. 2-3, p. 317-324, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer Verlag, 320 p., 1984.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, v. 83, n. 3, p. 482-504, 1976.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Why are phenolic compounds so important? In: WATERMAN, P. G.; MOLE, S. (Eds.). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1994.

WEISS, D. J. Leukocyte response to toxic injury. *Toxicologic Pathology*, v. 21, n. 2, p. 135-140, 1993.

WHO - World Health Organization. The world medicines situation. 2004, WHO/EDM/PAR/2004.5. Disponível em <http://www.searo.who.int/LinkFiles/Reports_World_Medicines_Situation.pdf>. Acesso em 22/09/2009.

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

WOERDENBAG, H. J.; MERFORT, I.; PABREITER, C. M.; SCHMIDT, T. J.; WILLUHN, G.; VAN UDEN, W.; PRAS, N.; KAMPINGA, H. H.; KONINGS, A. W. T. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against the GLC4 and the COLO 320 cell lines. *Planta Medica*, v. 60, p. 434-437, 1994.

WOLFSEGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, v. 288, n. 5472, p. 1765-1768, 2000.

WOOLFE, G.; MacDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (DEMEROL). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 80, n. 3, p. 300-307, 1944.

WYLLIE, E.; WYLLIE, R. Routine laboratory monitoring for serious adverse effects of antiepileptic medications: the controversy. *Epilepsia*, v. 32, suppl. 5, p. 74-79, 1991.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Research*, v. 739, n. 1-2, p. 104-110, 1996.

YASKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 202, p. 411-428, 1977.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research*, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

ZADINA, J. E.; HACKLER, L.; GE, L. J.; KASTIN, A. J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature*, v. 386, p. 499-502, 1997.

ZHU, X.; JIANG, C. 8-Quinolyl phosphate as a substrate for the fluorimetric determination of alkaline phosphatase. *Clinica Chimica Acta*, v. 377, n. 1-2, p. 150-153, 2007.

ZIELIŃSKA-PRZYJEMSKA, M.; WIKTOROWICZ, K. A *in vitro* study of the protective effect of the flavonoid silydianin against reactive oxygen species. *Phytotherapy Research*, v. 20, n. 2, p. 115-119, 2006.

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

PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESSA DISSERTAÇÃO**II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul, 2008**

MORAIS, A. L.; FERREIRA, S. A.; FERRARI, F. C.; CARNEIRO, C. M.; GRABE-GUIMARÃES, A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Avaliação da toxicidade *in vivo* do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* Mart. (“Arnica”). In: II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul, 2008, Belo Horizonte, Minas Gerais. Anais do II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul, 2008.

XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010

FERREIRA, S. A.; GRABE-GUIMARÃES, A.; CARNEIRO, C. M.; PAIVA, N. C. N.; SOUZA, M. R.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. In vivo short-term toxicity of crude ethanolic extract of *Lychnophora pinaster* Mart. (“Arnica”). In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010, João Pessoa, Paraíba. Anais do XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2010.

XII Seminário de Iniciação Científica da UFOP – XVII SIC, 2009

NEVES, M. C.; FERREIRA, S. A.; MORAIS, A. L.; MASIOLI, C. Z.; GRABE-GUIMARÃES, A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *Lychnophora pinaster* Mart. In: XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009, Ouro Preto. Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, v. 1, p. 28, 2009.

Prêmio de melhor trabalho na área de Ciências da Vida no XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP- título do trabalho: ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Lychnophora pinaster* Mart., UFOP, 2009.

MORAIS, A. L.; FERREIRA, S. A.; MASIOLI, C. Z.; GRABE-GUIMARÃES, A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A. Atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato etanólico e frações de *Lychnophora pinaster* Mart. In: XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, 2009, Ouro Preto. Anais do XVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP, v. 1, p. 25, 2009.

✓ **INTENÇÃO DE DEPOSIÇÃO DE PATENTE DE PRODUTOS MANUFATURADOS (TABLETES, COMPRIMIDOS, PÍLULAS, CÁPSULAS, EMULSÕES E SIMILARES).**

✓ **SUBMETER O ARTIGO: ASSESSMENT OF ACUTE ORAL TOXICITY OF CRUDE ETHANOLIC EXTRACT OF *LYCHNOPHORA PINASTER* MART. (ARNICA) À REVISTA TOXICON OU OUTRA.**