

# HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA

## ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae-Papilionoidea)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Piracicaba  
2006

# HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA

## ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO ÓLEO DAS SEMENTES DE

*Pterodon pubescens* Benth. (*Leguminosae-Papilionoidea*)

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Mary Ann Foglio

Banca examinadora:

Prof.(a) Dr.(a) Mary Ann Foglio

Prof.(a) Dr.(a) Patrícia Corrêa

Prof.(a) Dr.(a) Vera Rehder

Piracicaba  
2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Sp46a Spindola, Humberto Moreira.  
Atividade antinociceptiva do óleo das sementes de *Pterodon pubescens* Benth (*Leguminosae-Papilionoidea*). / Humberto Moreira Spindola. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

Orientadores: Mary Ann Foglio, João Ernesto de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Produtos naturais. 2. Extração. I. Foglio, Mary Ann. II. Carvalho, João Ernesto de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: *Pterodon pubescens* Benth. Seed's oil antinociceptive activity

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Natural products. 2. Extraction

Área de concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca examinadora: Vera Rehder, Patrícia Corrêa, Mary Ann Foglio

Data da defesa: 17/02/2006



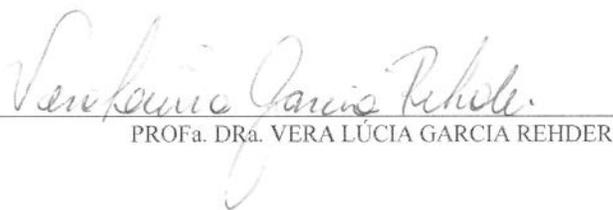
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 17 de Fevereiro de 2006, considerou o candidato HUMBERTO MOREIRA SPINDOLA aprovado.

  
PROFa. DRa. MARY ANN FOGLIO

  
PROFa. DRa. PATRÍCIA CORRÊA DIAS

  
PROFa. DRa. VERA LÚCIA GARCIA REHDER

200614334

## *Agradecimentos...*

A Deus, pela dádiva da vida...

A meus pais Eneo e Márcia, pela educação e ensinamentos de caráter e perseverança...

As minhas irmãs Anelise e Viviane, pela confiança em mim depositada...

A todos os mestres que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho...

A minha grande amiga, além de orientadora Mary Ann, que me adotou nesta terra de gigantes, e que foi responsável pela realização deste sonho...

Ao amigo João Ernesto, pelos conhecimentos prestados...

Aos colegas de trabalho, pela amizade, ajuda e compreensão...

A todos os técnicos e estagiários que colaboraram de forma singular com a realização deste trabalho...

A FOP-UNICAMP e CPQBA, pela oportunidade ímpar e facilidades oferecidas...

A FAPESP e a CNPq pelo financiamento do projeto de pesquisa concedido...

A CAPES pela bolsa de mestrado...

Ao amigo Filipe, pelo incentivo ao ingresso na carreira acadêmica...

A todos meus amigos e amigas, de longe ou de perto, que torcem e vibram pelo meu sucesso...

...meu mais sincero, **OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .	xiii
RESUMO	01
ABSTRACT	03
1.INTRODUÇÃO	05
2.REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Dor e Nocicepção	15
2.2 Vias Noradrenérgicas	23
2.3 Vias Serotoninérgicas	24
2.4 Vias Dopaminérgicas	27
2.5 Vias Colinérgicas	28
2.6 Vias Óxido Nitrérgicas	29
2.7 Vias GABAérgicas	30
2.8 Vias Opioidérgicas	31
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Material	41
4.1.1 Drogas	41
4.1.2 Solventes e Reagentes	41
4.1.3 Material Vegetal	41
4.1.4 Animais	42
4.2 Métodos	42
4.2.1 Estudo Fitoquímico	42
4.2.1.1 Extração	42
4.2.1.2 Métodos Cromatográficos	43
4.2.1.2.1 Cromatografia em Coluna Filtrante	43
4.2.1.2.2 Cromatografia em Coluna Clássica	43
4.2.1.2.3 Cromatografia em Camada Delgada	43

4.2.1.2.4 Análise Qualitativa por CG-EM	43
4.2.2 Avaliação Farmacológica	44
4.2.2.1 Avaliação Hipocrática	44
4.2.2.2 Atividade Antinociceptiva	44
4.2.2.2.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	44
4.2.2.2.2 Algesia induzida por calor (Placa quente)	45
4.2.2.2.3 Algesia induzida por Formalina	45
4.2.2.2.4 Algesia induzida por capsaicina	46
4.3 Análise Estatística	46
5. RESULTADOS	47
5.1 Obtenção do Extrato Bruto (EB)	49
5.2 Ensaio com Extrato Bruto (EB)	50
5.2.1 Ensaio Hipocrático	50
5.2.2 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	51
5.2.2.1 Curva dose-resposta do EB	51
5.2.3 Teste da Placa Quente	52
5.2.3.1 Curva dose –resposta do EB	52
5.2.3.2 Curva dose-resposta EB	54
5.2.4 Teste da Formalina	55
5.3 Fracionamento I	57
5.4 Ensaio com frações resultantes fracionamento I	58
5.4.1 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	58
5.4.1.1 Avaliação das frações HS1, HS2, HS3, HS4 e HS5	59
5.4.2 Teste da Placa Quente	60
5.4.2.1 Avaliação das frações HS3, HS4 e EB	60
5.4.2.2 Curva dose-resposta fração HS3	61
5.4.2.3 Curva dose-resposta fração HS4	62
5.5 Fracionamento II	64
5.6 Ensaio com fração HS6 resultante do fracionamento II	67
5.6.1 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	67
5.6.1.1 Comparação frações HS3, HS6 e EB	68

5.6.2 Teste da Capsaicina	69
5.6.2.1 Comparativo das frações HS3 e HS6	69
5.6.3 Teste da Placa Quente	70
5.6.3.1 Efeito das frações HS3 e HS6, com Naloxona	70
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	91
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9. ANEXOS	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-HT- Serotonina
- AAEs- Aminoácidos excitatórios
- AC- Adenilato ciclase
- Ach- Acetilcolina
- ATP- Trifosfato de adenosina
- B-EP- Beta endomorfina
- CCD- Cromatografia em camada delgada
- CG- Cromatografia gasosa
- CGRP- Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- DA- Dopamina
- DIN- Dinorfina
- DRT- Núcleo dorso reticular
- EB- Extrato bruto de sementes da *Pterodon pubescens* Benth.
- EM- Endomorfina
- EM- Espectrometria de massas
- ENC- Encefalina
- FAP- Fibra aferente primária
- GABA- Ácido gama amino butírico
- GAL- Galanina
- GLU- Glutamato
- GRD- Gânglio da raiz de projeção
- i.p.- Via intraperitoneal
- INES- Interneurônios excitatórios
- ININ- Interneurônio inibitório
- INIS- Interneurônios inibitórios
- MAO- Mono amina oxidase
- NMDA- N-metil-D-aspartato

- NO- Óxido nítrico
- NOP- Receptor de nociceptina
- NOR- Noradrenalina
- NOs- Óxido nítrico sintase
- NP- Neurônio de projeção
- NTS- Núcleo do trato solitário
- PAG- Substância cinzenta periaquedutal
- PBN- Núcleo parabraquial
- PBS- Solução tamponada
- PGs- Prostaglandinas
- PLC- Fosfolipase C
- RVM- Medula rostroventricular
- SNC- Sistema nervoso central
- SP- Substância P
- v.o.- Via oral
- VDF- Via descendente facilitatória
- VDI- Via descendente inibitória

## RESUMO

A espécie *Pterodon pubescens* Benth. (sinonímia botânica – *Pterodon emarginatus* Vog.), é encontrada no Brasil nos cerrados dos estados de MG, MS, GO e SP. A infusão das sementes é popularmente utilizada como analgésico (dores na coluna, dor de garganta, reumatismo), e até mesmo como tônico (fortificante) e depurativo. Alguns trabalhos demonstraram ação analgésica do óleo extraído das sementes da *P. pubescens* (extratos: etanólico, hidroalcoólico). Neste trabalho, produzimos o extrato bruto diclorometânico (EB) das sementes para avaliar a atividade antinociceptiva, haja visto que apresenta os mesmos constituintes do óleo obtido por prensagem das sementes e que demonstrou atividade antiinflamatória em trabalhos preliminares. Demonstramos que o EB possui ação antinociceptiva em 3 diferentes ensaios farmacológicos: contorções abdominais induzidas por ácido acético (300 e 100 mg/kg, 57% e 46% de redução respectivamente), teste da placa quente (100 mg/kg, aumento de 260%, 226% e 225% no tempo de reação aos 30, 60 e 90 minutos, respectivamente) e teste da formalina (redução de 42% e 92% do tempo de reação para as fases I e II do teste, respectivamente). Com o fracionamento do extrato, identificamos as frações mais ativas nos mesmos modelos utilizados para o EB. Nas frações mais ativas, HS3 e HS4, identificou-se tanto a presença do diterpeno furânico 6 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -acetoxivouacapano com ação antiinflamatória, quanto um componente majoritário. Obteve-se a fração HS6, oriunda da fração HS3 sem a presença do composto 6 $\alpha$ -hidroxi, 7 $\beta$ -acetoxivouacapano. Sua ação antinociceptiva foi avaliada nos modelos: contorções abdominais induzidas por ácido acético (63% de redução do número de contorções), teste da placa quente (aumento de 179% e 205% no tempo de reação aos 30 e 60 minutos) e teste da capsaicina (redução de 82% no tempo de reação). A fração HS6 demonstrou ação antinociceptiva em todos os modelos avaliados, o que supõe a participação tanto central quanto periférica no mecanismo de analgesia. Para determinação do mecanismo de ação antinociceptiva da fração HS6, avaliou-se preliminarmente, a

participação de receptores opióides (semelhante à morfina) na atividade antinociceptiva. Utilizando cloridrato de naloxona, um antagonista opióide não específico, no teste da placa quente, podemos demonstrar que a atividade antinociceptiva não está relacionada às vias opioidérgicas. A próxima etapa do trabalho será à avaliação do mecanismo de ação antinociceptiva da fração HS6 das sementes da *Pterodon pubescens* Benth.

## *ABSTRACT*

*Pterodon pubescens* Benth. (*Pterodon emarginatus* Vog.), is found throughout central and southeast Brazil. Folk medicine has employed this species, for pain relieve, anti-inflammatory, analgesic (sorethroat and back pain) , tonic and depurative. Studies have demonstrated the analgesic activity of crude *P. pubescens* alcoholic extracts (ethanolic and hydroalcoholic extracts). This work evaluated the antinociceptive activity of crude dichloromethane seed's extracts (EB) in three pharmacological assays( induced abdominal constriction by acetic acid, hot plate test and formalin test). Bioassay guided purification of EB permitted identification of the most active fractions. The resulting fractions HS3 and HS4 were the most active in the experimental models tested. Both most active fractions, HS3 and HS4, displayed the presence of furan diterpen  $6\alpha$  - hydroxi,  $7\beta$  - acetoxivouacapan previously demonstrated to exhibite anti-inflammatory activity. Evaluation of fraction HS6, free of  $6\alpha$  - hydroxi,  $7\beta$  - acetoxivouacapan, maintained the antinociceptive activity when evaluated on induced abdominal contortions; hot plate test and capsaicin in mice experimental models suggesting either peripheral and central pharmacological mechanisms. These assays also demonstrated that the antinociceptive activity has no relationship with opioid receptors. Sequent studies will be undertaken to determine the antinociceptive activity pharmacological mechanisms of *Pterodon pubescens* Benth. crude dichloromethane seed's extract.

# *1. Introdução*

Estima-se em 246 mil a 279 mil o número de espécies de plantas catalogadas no mundo (Peixoto e Amorim, 2003), sendo que o Brasil é detentor de 14 a 20% deste montante (Sojearto, 1996). Porém, já foram assinaladas espécies não encontradas em campo, sugerindo que as mesmas estejam extintas, pela destruição de seus ambientes naturais (Peixoto e Amorim, 2003).

O ritmo atual de devastação já é considerado de 50 a 100 vezes maior que aquele observado no passado. Considera-se que, mantendo o ritmo de devastação, até o ano de 2100 quase que a totalidade das florestas serão eliminadas, e mesmo com a redução total da perda da biodiversidade, seriam necessários milhões de anos para a recuperação da diversidade biológica por meios evolutivos (Nodari e Guerra, 1999).

Três razões principais justificam a preocupação com a conservação da diversidade biológica: *porque* se acredita que a diversidade biológica seja uma propriedade fundamental da natureza, responsável pelo equilíbrio e estabilidade dos ecossistemas; *porque* se acredita que a diversidade biológica esteja se deteriorando, inclusive com aumento da taxa de extinção de espécies, devido ao impacto das atividades antrópicas e *porque* a diversidade biológica representa um imenso potencial de uso econômico, em especial pela biotecnologia (Cordell, 2000).

Com relação ao desenvolvimento de medicamentos, este contexto é particularmente importante, uma vez que, as plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas como drogas convencionais no futuro ou ainda como ferramentas bioquímicas para a elucidação de aspectos etiológicos de determinadas patologias que ainda permanecem obscuros (Lewis e Hanson, 1991; Cragg e Newman, 2005).

Outro aspecto importante é a obtenção de compostos que, apesar de apresentarem potencial terapêutico limitado, podem ser utilizados como matéria prima inicial para obtenção de produtos semi-sintéticos com atividade farmacológica mais pronunciada. Como exemplos, pode ser citado o desenvolvimento do atracúrio a partir dos alcalóides do curare, obtidos de *Chondrodendron tomentosum* e dos anestésicos locais a partir da cocaína (Waigh, 1988).

Até meados do século XX as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química (que teve início no final do século XIX) iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (Calixto, 2003).

Um estudo sobre produtos naturais como fonte de novas drogas entre os anos de 1981 e 2002, indicou que 67% das 877 pequenas moléculas (com potencial farmacológico), são de origem sintética, porém 16,4% correspondem a moléculas sintéticas com grupos farmacofóricos derivados diretamente de produtos naturais (Cragg e Newman, 2005).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente. Várias empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área. É importante salientar que na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo mantinha qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais e atualmente, pelo menos metade delas introduziram este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (Fellows, 1995; Cragg e Newman, 2005). A última década registrou um aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de espécies vegetais, evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de química e farmacologia (Rates, 2001; Calixto, 2003).

***Pterodon pubescens* Benth. (Sucupira)**

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

A espécie vegetal, *Pterodon pubescens* Benth. -sinonímia botânica *Pterodon emarginatus* Vog. - é uma árvore da família das *Leguminosae-Papillonoideae*. Conhecida popularmente como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa, podemos encontrá-la principalmente no cerrado dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. Esta espécie atinge de 8-16 metros, com tronco de 30-40 centímetros de diâmetro; possui folhas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro (fig.1) (Lorenzi, 1998).

Um estudo etnobotânico em 30 cidades do interior de Minas Gerais relatou o uso popular da sucupira (*P. pubescens* Benth.) no tratamento do reumatismo, dores de garganta, problemas da coluna, como tônico e depurativo (Carvalho, 1999).

A pesquisa com plantas que são empregadas como analgésico ou antiinflamatório na medicina popular é, portanto, uma das mais lógicas e produtivas maneiras de pesquisar uma nova droga para uso terapêutico (Elizabetsky, et al., 1995).

O gênero *Pterodon* compreende 4 espécies nativas do Brasil: *P. abruptus* Benth., *P. apparucuri* Pedersoli, *P. pubescens* Benth. (*P. emarginatus*

Vog.) e *P. polygalaefflorus* Benth. O estudo dessas espécies foi motivado pela comprovação da ação anticercariana do óleo da *P. emarginatus* Vog. e de outras espécies, em adição a atividade antimicrobiana *in vitro* também obtida com o óleo da *P. emarginatus* Vog. (Carvalho, 1999).

O diterpeno 14, 15- epoxigeranilgeraniol e alguns derivados foram isolados da *P. pubescens* Benth., demonstrando serem eficientes agentes quimioprolifáticos contra infecções causadas por cercarias de *S. mansoni* quando aplicados topicamente na cauda de ratos (Dos Santos Filho et al., 1972). Em 1970, novos diterpenos foram obtidos por Mahajan e Monteiro, e no mesmo ano, terpenos foram isolados por Fascio e colaboradores (Carvalho, 1999).

A partir de um estudo químico de leguminosas brasileiras, foram isolados isoflavonóides da *Pterodon pubescens* Benth. Continuando o estudo da espécie, novos diterpenos foram isolados e mostraram eficácia no tratamento de eschistossomose (Carvalho, 1999).

Quatorze diterpenos furânicos foram identificados e isolados dos frutos do gênero *Pterodon*. O diterpeno furânico – Vouacapano (6 $\alpha$ -,7 $\beta$ -dihidroxivouacapanoato de sódio), foi isolado da espécie *P. polygalaefflorus* Benth. e sua atividade antiinflamatória demonstrada através do modelo de pata induzido por carragenina (Carvalho, 1999).

A atividade antinociceptiva do Vouacapano também foi estudada por Duarte e colaboradores em 1996, sugerindo uma possível ação catecolaminérgica desse composto, atribuída a redução da liberação de catecolaminas.

A atividade antiinflamatória do extrato hexânico da *P. pubescens* Benth., foi estudada por Carvalho e colaboradores, sendo sugerido que a atividade antiinflamatória do extrato hexânico estaria relacionada à inibição da liberação de prostaglandinas e outros mediadores envolvidos no sistema cininas. Sugeriu-se

ainda que a atividade antiinflamatória do extrato poderia estar relacionada a presença de compostos terpênicos (Carvalho, 1999).

Um estudo do extrato hidroalcoólico das sementes da *P. pubescens* Benth. possibilitou a confirmação de seus efeitos em modelo de artrite experimental e a ausência de toxicidade subaguda (Coelho et al., 2001).

Silva e colaboradores (2004) identificaram o sesquiterpeno  $6\alpha,7\beta$ -dihidroxiouacapano como responsável pela atividade antiedematogênica do óleo extraído das sementes da *P. pubescens*.

Recentemente Coelho e colaboradores (2005) demonstraram a ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da *P. pubescens*, atribuída à presença de derivados vouacapânicos. Os mecanismos responsáveis pela ação antinociceptiva, ainda permanecem obscuros, porém parecem estar relacionados à inibição central ou periférica (Coelho et al., 2005).



**Figura 1:** Foto da árvore e das folhas da *Pterodon pubescens* Benth.



**Figura 2:** Foto das sementes da *Pterodon pubescens* Benth.

## *2. Revisão da Literatura*

## **2.1 DOR e NOCICEPÇÃO**

A dor é uma experiência consciente que inclui componentes característicos, afetivos-motivacionais e cognitivos que produzem uma sensação unificada (Casey, 1999). Ela normalmente serve como um artifício de aviso, ou seja, um sistema de alarme responsável pela manutenção da integridade do organismo. A resposta nociceptiva é ativada somente por estímulos nocivos atuando em um aparato sensorial especializado de alto limiar. Sendo assim a nocicepção é essencial para a sobrevivência de organismos em ambientes potencialmente hostis (Scholtz e Woolf, 2002).

Existem muitos componentes da dor e eles podem ser entendidos pela identificação de quatro amplas categorias: a nocicepção, a percepção da dor, o sofrimento e o comportamento da dor, que podem existir independentemente da existência de um dano tecidual.

A **nocicepção** é a detecção do dano tecidual pelas fibras A $\delta$  e C. Estas fibras sensoriais podem ser sensibilizadas por alterações inflamatórias e neurais em seus arredores (ambiente). A **percepção** da dor é freqüentemente disparada por um estímulo nocivo, como um ferimento ou doença. Ela pode também ser gerada por lesões no sistema nervoso periférico ou central, como aquelas observadas em pacientes com neuropatia diabética. O **sofrimento** é a resposta negativa induzida pela dor, mas também pode ser desencadeado por outros fatores como medo, ansiedade e estresse. O **comportamento da dor** é um resultado da dor e do sofrimento; são as atitudes que as pessoas fazem ou deixam de fazer e que podem ser atribuídos à presença do tecido danificado (Loeser e Melzack, 1999).

A dor também pode ser classificada de acordo com o tempo de duração, podendo ser designada como dor transitória ou passageira, dor aguda e

dor crônica. A **dor transitória** é evocada pela ativação dos nociceptores na pele ou em outros tecidos do corpo, na ausência de qualquer dano tecidual. Ela pode estar presente todos os dias sem que necessariamente haja algum tipo de dano. Por outro lado, a **dor aguda** é desencadeada após uma lesão substancial de algum tecido e posterior ativação dos nociceptores (Carr e Goudas, 1999; Loezer e Melzack, 1999).

O local da lesão altera a resposta característica dos nociceptores, suas conexões centrais e o sistema nervoso autônomo na região, porém a cura pode ser espontânea, ou seja, sem necessidade de intervenção médica. Este tipo de dor ainda pode ser visto após um trauma, intervenções cirúrgicas e algumas doenças. Geralmente a dor aguda persiste por apenas alguns dias ou poucas semanas. As dores que persistem durante ou após a recuperação dos tecidos não são mais consideradas agudas (Loezer e Melzack, 1999).

Na **dor crônica**, o tratamento apenas provoca uma remissão transitória nos sintomas, mas não resolve o processo patológico responsável pelo desencadeamento da dor, ou seja, assim que suspenso o tratamento, o paciente voltará a sentir a dor. Neste caso, o dano tecidual excedeu a capacidade de cura do organismo, que pode ter sido provocado por uma extensa lesão, ocasionando um subsequente déficit na cicatrização. Outra possibilidade é o próprio envolvimento do sistema nervoso, como por exemplo, no caso de neuropatias. Em resumo, a dor não é distinta em aguda ou crônica apenas pelo tempo que ela se apresenta, mas sim pela habilidade do organismo em restabelecer suas funções fisiológicas (Loezer e Melzack, 1999).

O aparato sensorial especializado pela percepção da dor é bastante complexo e envolve estruturas que são presentes desde a pele e órgãos até regiões especializadas do sistema nervoso central (Fürst, 1999). Além disso, a transmissão do sinal nociceptivo esta sujeita a uma variedade de moduladores que podem atuar de forma facilitatória ou inibitória, desde os nociceptores até as

estruturas cerebrais responsáveis pela percepção da dor (Fürst, 1999; Gebhart, 2004).

Em condições fisiológicas normais, os sinais nociceptivos são gerados apenas por estímulos intensos, sejam eles químicos, mecânicos ou térmicos, que conseqüentemente causam o aumento nas descargas das fibras aferentes primárias (FAP). Estas fibras podem ser classificadas em dois tipos, as A $\delta$  e C. Estas fibras apresentam características anatômicas e funcionais distintas, porém são componentes importantes para o início da transmissão do impulso nociceptivo.

As **fibras C** são consideradas fibras finas (0,4-1,2  $\mu$ m de diâmetro), são amielinizadas e apresentam baixa velocidade de condução do impulso (0,65 – 2,0 m/s). Muitas das fibras C são chamadas também de nociceptores polimodais, ou seja, respondem a estímulos químicos, térmicos e mecânicos. Outras são insensíveis ao estímulo mecânico, mas respondem ao calor nocivo. Além disso, muitas delas também respondem a estímulos químicos nocivos, como ácidos e a capsaicina (Besson, 1999; Millan 1999; Julius e Basbaum 2001).

As **fibras A $\delta$**  são consideradas de diâmetro intermediário (2 – 6  $\mu$ m de diâmetro), são mielinizadas e apresentam velocidade de condução intermediária (12 – 30 m/s). Existem dois tipos de nociceptores A $\delta$  e ambos respondem ao estímulo mecânico intenso, mas podem ser distinguidos por sua responsividade diferente ao estímulo térmico ou como são afetados pela lesão tecidual. O **tipo I** tem condutância rápida e responde fracamente a estímulos térmicos de baixa e alta intensidade e a estímulos químicos. Porém, quando ocorre sensibilização, estas fibras passam a responder a estímulos térmicos de alta intensidade, com respostas sustentadas, de longa duração e latência demorada. Já o **tipo II**, que é menos comum e de condutância mais lenta, tem um limiar menor para estímulos térmicos que o tipo I, e ainda, responde de forma mais rápida a estímulos (Millan, 1999).

As fibras A $\delta$  e C transmitem a informação nociceptiva dos sítios somáticos e viscerais (Cervero, 1995) para o corno dorsal da medula espinhal (Carr e Goudas, 1999), sendo que as fibras A $\delta$  e as fibras C medeiam a “primeira” e “segunda” dor, respectivamente, nomeadas de dor rápida, aguda ou lancinante e demorada, mais difusa, uma dor mais atenuada, evocada pelo estímulo nocivo (Julius e Basbaum, 2001). Entretanto, em órgãos internos esta diferenciação não é evidente, a dor caracteriza-se por ser pouco localizada, ou seja, ela se apresenta de maneira difusa (Cervero, 1995; Calvino e Grilo, 2005).

Existe ainda um terceiro tipo de FAP, as  **fibras A $\beta$** . Elas são consideradas fibras espessas (>10  $\mu$ m de diâmetro), são mielinizadas e apresentam rápida velocidade de condução (30 – 100m/s) (Millan, 1999; Calvino e Grilo, 2005).

Estas fibras não são responsáveis pela transmissão do estímulo nociceptivo em condições normais, elas detectam estímulos inócuos, tais como, o toque, vibração ou pressão aplicada sobre a pele, articulações e músculos. Elas ainda podem reduzir a dor, e isto ocorre quando elas são ativadas pela fricção das mãos no local da lesão (Carr e Goudas, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

O estímulo natural de alguns nociceptores é bastante difícil de identificar, assim, eles são chamados de nociceptores “silenciosos” ou “adormecidos” e são responsivos apenas quando são sensibilizados por um processo inflamatório, resultado de um dano tecidual (Besson, 1999; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

A destruição do tecido por si só pode ativar os nociceptores, após uma lesão, e diversos mediadores poderão ser liberados no tecido danificado. Neste contexto podemos citar o glutamato e outros aminoácidos excitatórios (AAEs), neuropeptídeos, como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o trifosfato de adenosina (ATP), o óxido nítrico (NO),

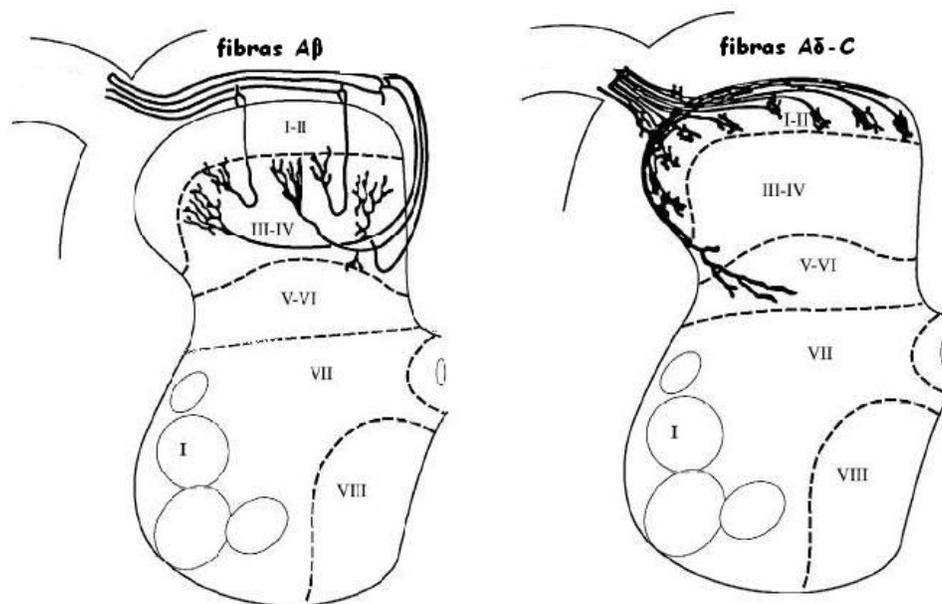
prostaglandinas (PGs) e neurofinas (fatores de crescimento). Estes transmissores e uma diversidade de outros neuropeptídeos, enzimas e uma mistura de muitas outras moléculas exibem um complexo exemplo de co-localização, co-modulação e co-liberação dos mediadores nas FAPs (Millan, 1999).

Quando ocorre um dano significativo nos tecidos, a dor é freqüentemente mais persistente e é associada a um processo inflamatório e, nestas circunstâncias, geralmente ocorrem a hiperalgesia (definida como uma diminuição do limiar para provocar respostas indicativas de nocicepção por uma alteração na transmissão da dor) e alodínia (dor em resposta a um estímulo não nocivo) nos tecidos adjacentes (Dray, 1997).

O desencadeamento de uma resposta inflamatória local será sustentado por múltiplos mediadores e células imunes e estes irão alterar o padrão normal de resposta nociceptiva. Estes mediadores sensibilizam os nociceptores funcionais ou ativam aqueles que estão latentes (“nociceptores silenciosos”). Os nociceptores sensibilizados provocam um aumento no padrão basal das descargas, uma redução dos limiares de estímulos sobre o qual a descarga basal aumenta, um aumento supranormal no padrão das descargas, o que aumenta o poder do estímulo, ou uma combinação destas mudanças. No sítio da lesão, os mediadores inflamatórios (monoaminas, citocinas, prostanóides, peptídeos), neurotransmissores e fatores de crescimento banham os nociceptores sensibilizados. Interações entre múltiplos mediadores e seus respectivos receptores permitem a integração sensorial e modulação dos impulsos nociceptivos na periferia (Carr e Goudas, 1999).

Este conjunto de fatores resulta em mudanças nos limiares de ativação dos nociceptores e mecanoceptores, facilitando então, o desencadeamento de uma resposta nociceptiva. Também ocorrem mudanças no SNC, particularmente evidenciadas na medula espinhal, onde os reflexos e atividade neuronal das células estão aumentados (Appleton, 1997).

Seguindo a transmissão do impulso da pele até o SNC, observa-se a importante participação da medula espinhal. Ambas as FAPs (A $\delta$  e C) que detectam os estímulos na pele e órgãos internos, terminam em lâminas superficiais e profundas do corno dorsal da medula. As camadas mais superficiais incluem a zona marginal, ou lâmina I e a substância gelatinosa, ou lâmina II e III, enquanto que as profundas envolvem as lâminas V e VI, além da lâmina X. As fibras A $\beta$ , que são responsáveis por estímulos inócuos, terminam nas lâminas III e VI (Füsrt, 1999; Millan, 1999; Millan, 2002), também chamado de nucleus proprius (Millan, 1999). A localização anatômica das fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C na medula espinhal está ilustrada na figura 3.



**Figura 3:** Localização anatômica das fibras A $\beta$ , A $\delta$  e C no corno dorsal da medula espinhal (Calvino e Grilo, 2005).

No corno dorsal, o estímulo nociceptivo estimula diretamente os neurônios de projeção (NPs), ou indiretamente via interneurônios excitatórios (INEs). Além disso, as FAPs também podem ser moduladas por interneurônios inibitórios (INIs), que irão interagir com os NPs, INEs ou nos próprios terminais das

FAPs, desempenhando um papel muito importante no controle da transmissão nociceptiva (Castro, 2000; Millan, 2002).

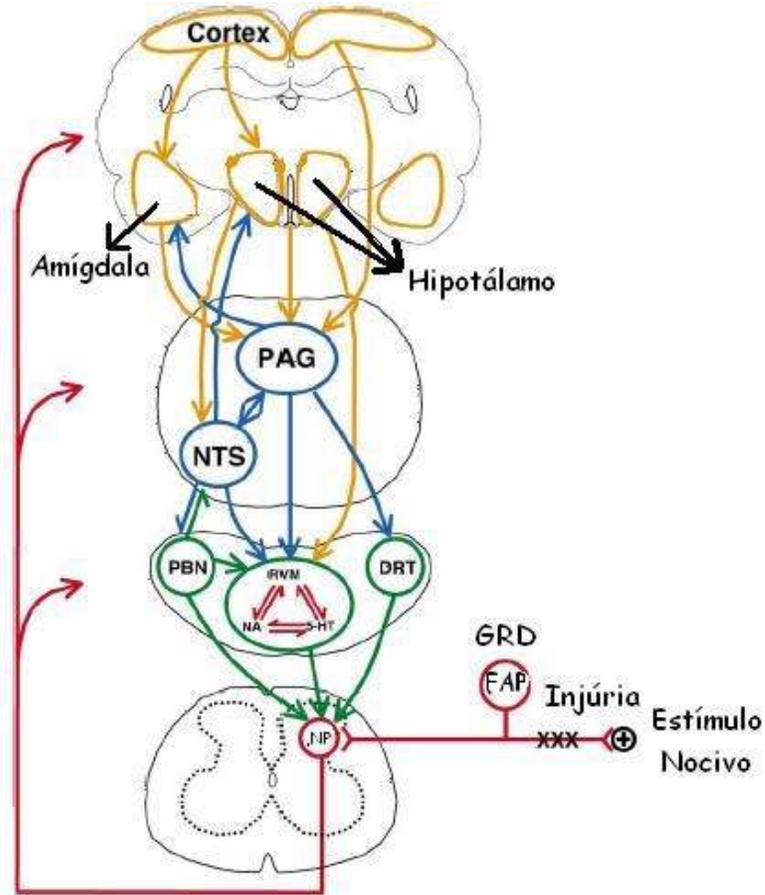
O trajeto ascendente, em seguida, retransmite a informação nociceptiva rostralmente para estruturas talâmicas, límbicas e corticais, responsáveis pelas respostas afetivas e sensorial-discriminativa da dor (Carr e Goudas, 1999).

Segundo o modelo descrito inicialmente por Melzack (1999), na medula, as informações nociceptivas vindas das vísceras, pele e outros órgãos, estão sujeitas a uma grande variedade de transmissores que irão filtrar e modular a transmissão do impulso nociceptivo para o cérebro (Besson, 1999; Fürst, 1999; Millan, 2002).

Estas substâncias moduladoras da resposta nociceptiva poderão, por vezes, atuar como pronociceptivas (controle descendente facilitatório) ou antinociceptivas (controle descendente inibitório), dependendo de diversos fatores, tais como o tipo e intensidade do estímulo, região central ativada pelo estímulo, tipo de receptor ativado, entre outros. Por este motivo, a distinção entre transmissor inibitório e facilitatório se torna bastante difícil, exigindo estudos específicos para determinada área central, ou para determinado receptor do neurotransmissor em questão (Millan, 2002).

Entre as áreas centrais já estudadas e bem caracterizadas encontra-se o hipotálamo, o núcleo parabraquial, o núcleo do trato solitário, a medula rostroventromedial, o núcleo dorso reticular da medula, substância cinzenta periaquedutal (PAG) e o córtex cerebral (Millan, 2002). Os neurônios projetados destas áreas (Via Descendente Inibitória – VDI ou Via Descendente Facilitatória – VDF) contêm os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor e entre eles estão a noradrenalina (NOR), serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), ácido gama amino butírico (GABA), dopamina (DA), encefalina (ENC), dinorfina

(DIN), endorfina (EM), adenosina. Neste contexto, é importante salientar que a NOR e a 5-HT são os transmissores das VDIs mais amplamente estudados, e são considerados os seus principais neurotransmissores inibitórios (Fürst, 1999; Millan, 2002). As estruturas cerebrais envolvidas na iniciação e modulação do controle descendente da informação nociceptiva estão ilustradas na figura 4.

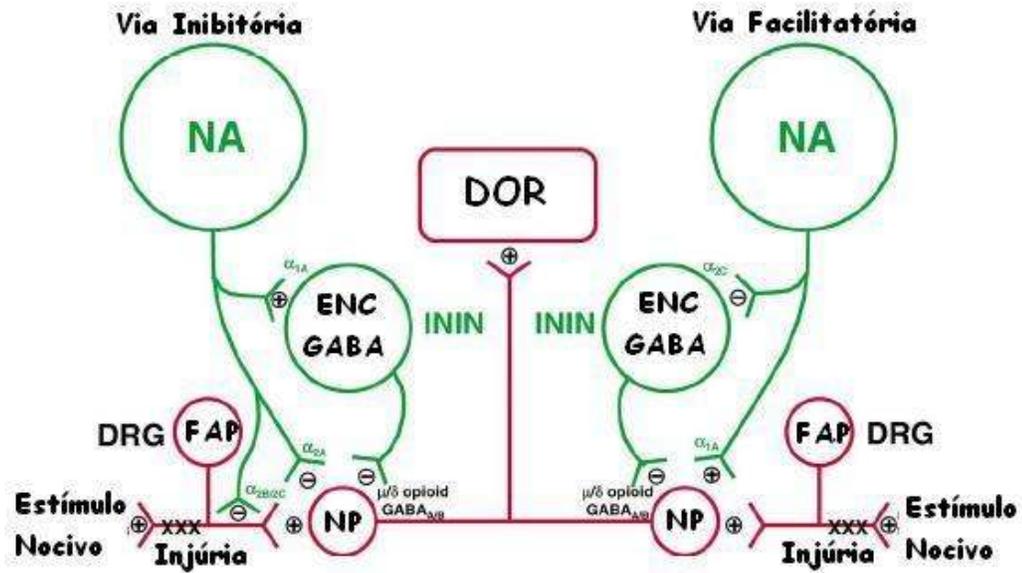


**Figura 4:** Inter-relação entre estruturas cerebrais envolvidas na iniciação e modulação do controle descendente da informação nociceptiva. Abreviaturas: PAG, substância cinzenta periaquedutal; NTS, núcleo do trato solitário; PBN, núcleo parabraquial; DRT, núcleo dorso reticular; RVM, medula rostroventricular; NA, noradrenalina; 5HT, serotonina; FAP, fibra aferente primária; NP, neurônio de projeção; GRD, gânglio da raiz de projeção (adaptado de Millan, 2002).

## **2.2 Vias Noradrenérgicas:**

Os receptores noradrenérgicos mais expressivos nas VDIs são os  $\alpha_2$ . Estes receptores estão acoplados à proteína  $G_{i/o}$  e provocam a inibição da adenilato ciclase (AC), aumentam as correntes de potássio ( $K^+$ ) e suprimem as correntes de cálcio ( $Ca^{+2}$ ). Estes mecanismos são os responsáveis pela atividade antinociceptiva destes receptores. No corno dorsal, a ativação destes receptores provoca uma redução moderada da estimulação dos NP pelas FAPs, e também uma redução na liberação de transmissores pronociceptivos, como a SP e o glutamato de seus terminais (Millan, 1997).

Os receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos também podem desempenhar a atividade antinociceptiva por permitir interações com outros transmissores como a galanina, GABA e encefalinas, uma vez que as VDIs noradrenérgicas estão co-localizadas com estes transmissores (Fürst, 1999; Millan, 1999). Os agonistas dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos podem ainda cooperar com a atividade de outras classes de analgésicos, como os agonistas colinérgicos, os agonistas opióides, os agonistas GABAérgicos, os antagonistas dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), os anestésicos locais, os ligantes serotoninérgicos, os agonistas dos receptores de adenosina e os inibidores da enzima ciclooxigenase (Ossipov, 1985; Suh, 1989; Sawynok e Reid, 1992; Zhang, 1997; Poon e Sawynok, 1998). Isso implica em uma possível redução nas doses utilizadas nas monoterapias, evidenciados pela redução dos efeitos colaterais, e um ganho na atividade antinociceptiva destas classes de medicamentos (Millan, 2002). Os receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos também apresentam um papel importante na modulação da nocicepção e eles estão acoplados positivamente a proteína  $G_{q/11}$  e ativam canais de  $Ca^{+2}$  e a fosfolipase C (PLC), mobilizando  $Ca^{+2}$  intracelular. Alguns trabalhos demonstram que os receptores  $\alpha_1$  produzem analgesia. Isto é observado nos relatos da atividade antinociceptiva da fenilefrina (agonista  $\alpha_1$  adrenérgico), sendo bloqueada pela ação da prazosina (antagonista  $\alpha_1$  adrenérgico) (Tasker et al., 1992). Vias inibitórias e facilitatórias noradrenérgicas ilustradas na figura 5.



**Figura 5:** Exemplo das vias inibitórias e facilitatórias noradrenérgicas. Abreviaturas: NA, noradrenalina; ENC, encefalina; GABA, ácido gama-amino butírico; ININ, interneurônio inibitório; GRD, gânglio da raiz de projeção; NP, neurônio de projeção; FAP, fibra aferente primária (adaptado de Millan, 2002).

### 2.3 Vias Serotoninérgicas:

A ativação das fibras descendentes serotoninérgicas não é sinônimo de indução de analgesia mas de concomitante ação da 5-HT de forma pró-nociceptiva (VDEs) e antinociceptiva (VDIs) no corno dorsal da medula (Millan, 1999).

Várias classes de receptores da 5-HT já foram identificados, e entre eles estão o 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub>. O papel destes receptores é bem distinto entre eles, e suas localizações também. Os receptores 5-HT<sub>1A</sub> estão negativamente acoplados a AC e sua ativação abre os canais de K<sup>+</sup> e fecham os canais de Ca<sup>+2</sup>. Eles exercem uma influência inibitória bastante pronunciada sobre a excitabilidade neuronal (Millan, 2002). A atividade antinociceptiva da 5-HT atuando em seu receptor 5-HT<sub>1A</sub> já foi

evidenciada através de diversos experimentos (Bardin et al., 2000; Bardin et al., 2001; Colpaert et al., 2002; Deseure et al., 2002).

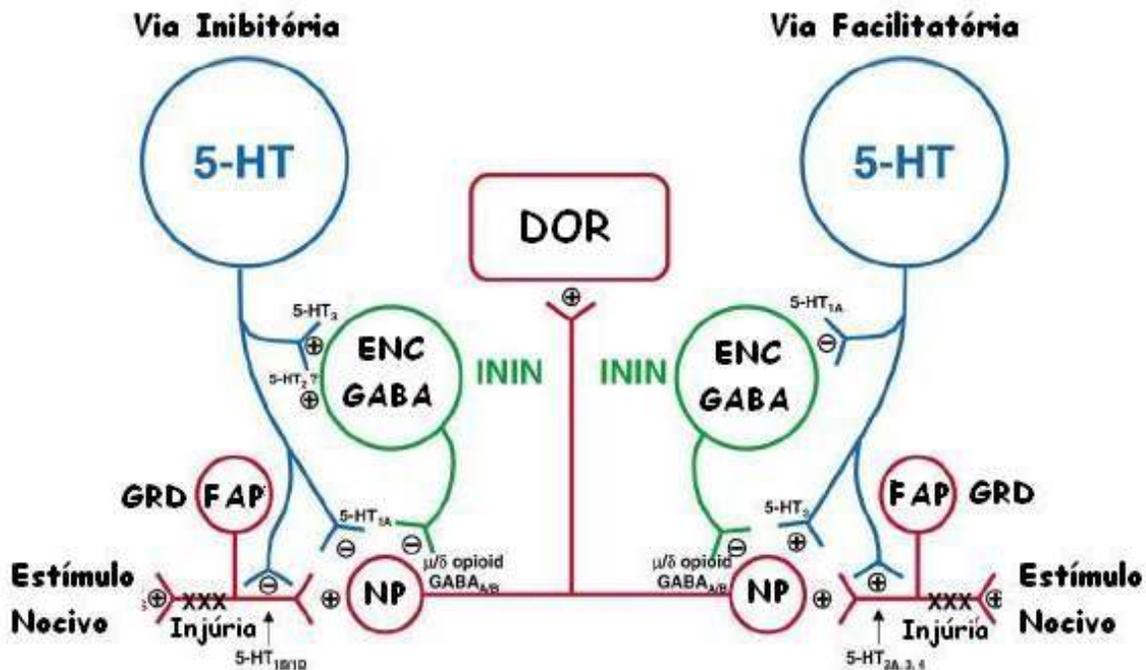
Os receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> também estão acoplados negativamente a AC e suas ativações aumentam as correntes de K<sup>+</sup>, contribuindo para suas influências inibitórias na atividade neuronal. Estes três receptores estão intimamente relacionados quanto a suas localizações, sendo que suas ativações demonstraram atividade antinociceptiva, porém, supõe-se uma atividade mais expressiva dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> sobre os outros dois (Millan, 2002).

Os receptores 5-HT<sub>2</sub> (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>) estão acoplados positivamente a PLC e exercem uma atividade inibitória sobre as correntes de K<sup>+</sup>, evidenciando uma influência excitatória sobre atividade neuronal. Basicamente eles apresentam atividades pronociceptivas. Entretanto, o posicionamento de receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> em sítios INIs podem, evidentemente transformar a atividade pronociceptiva em um papel antinociceptivo destes receptores (Millan, 2002).

O receptor 5-HT<sub>3</sub> é um canal iônico pentamérico, distinguindo drasticamente das outras classes de receptores serotoninérgicos. Sua ativação aumenta a atividade da PLC, reforçando sua influência facilitatória sobre a excitabilidade neuronal. (Millan, 2002). Isto implicaria em um papel pronociceptivo do mesmo, porém já foi descrita a atividade antinociceptiva dos receptores 5-HT<sub>3</sub>. A suposição é que ele esteja também atuando nos INIs, não só pela atividade do receptor 5-HT<sub>3</sub>, mas também auxiliando os INIs GABAérgicos e encefalinérgicos (Millan, 2002).

Existem fortes evidências de que a 5-HT aumentaria a ação das VDIs noradrenérgicas, demonstrando um sinergismo nas atividades das duas VDIs na produção da antinocicepção (Fürst, 1999). Também foi demonstrado que a serotonina age facilitando o efeito antinociceptivo de outros mediadores das VDIs

(Millan et al., 1997; Obata et al., 2003; Sounvoravong et al., 2004). Outras evidências vêm de que agentes que liberam ou inibem a recaptação de serotonina causam analgesia (Castro, 2000). As controvérsias sobre os efeitos pró ou antinociceptivos da 5-HT são muitas, isso porque, conforme o sítio onde ela é aplicada, o modelo experimental escolhido e a dose empregada, ela pode ter efeito pró ou antinociceptivo (Millan, 2002). Vias inibitórias e facilitatórias serotoninérgicas ilustradas na figura 6.



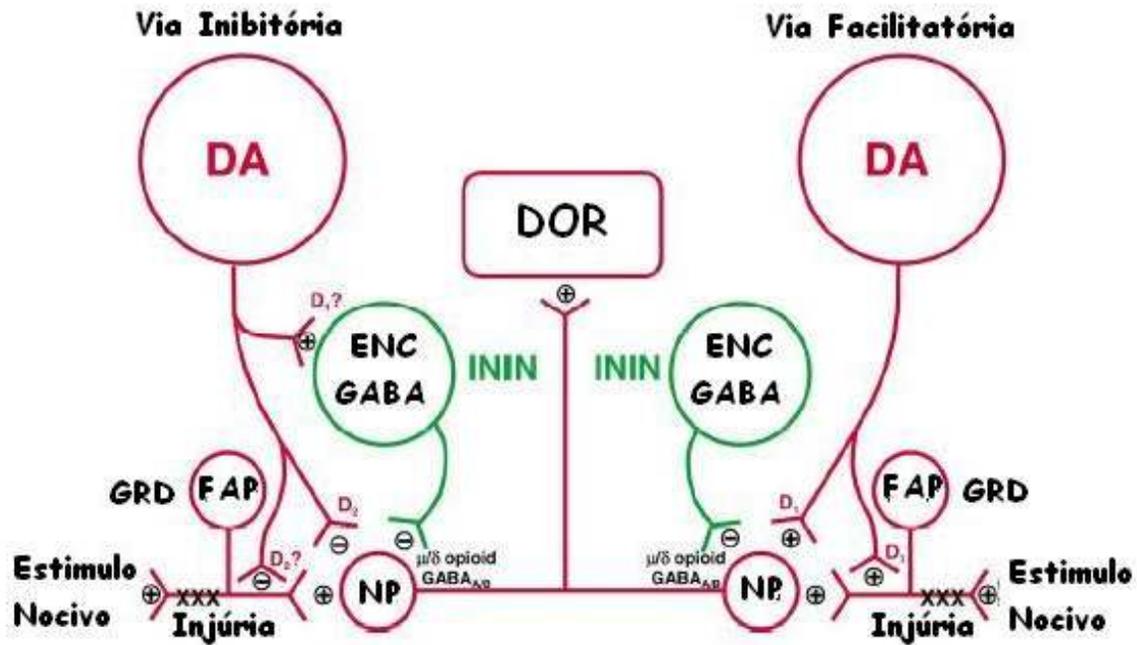
**Figura 6:** Exemplo das vias inibitórias e facilitatórias serotoninérgicas. Abreviaturas: NA, noradrenalina; ENC, encefalina; GABA, ácido γ-amino butírico; ININ, interneurônio inibitório; GRD, gânglio da raiz de projeção; NP, neurônio de projeção; FAP, fibra aferente primária (adaptado de Millan, 2002).

## **2.4 Vias Dopaminérgicas:**

As vias dopaminérgicas mesolímbica, mesocortical e nigroestriatal estão envolvidas na inibição da nocicepção em nível supra-espinhal. Elas são responsáveis pela ação antinociceptiva central e ainda, por modular os controles descendentes dopaminérgicos, atuando em sua família de receptores  $D_2$ , a qual inclui os receptores  $D_3$  e  $D_4$ . A estimulação destes receptores leva à inibição da AC, via proteína  $G_{i/o}$ . Também há uma supressão das correntes de  $Ca^{+2}$  e aumento nas correntes de  $K^+$ , promovendo então uma redução na atividade neuronal (Missale et al., 1998).

Quando existe a presença de um estímulo nocivo, agudo ou sustentado, ocorre um aumento na liberação de dopamina no corno dorsal da medula, sugerindo um aumento na atividade das VDIs dopaminérgicas. Também ocorre aumento nos níveis de dopamina no líquido cérebro espinhal em certos tipos de dores crônicas (Millan, 2002).

Vários experimentos realizados com agonistas dopaminérgicos também demonstraram um potencial antinociceptivo das vias dopaminérgicas (Zarrindast et al., 1999). Vias facilitatórias e inibitórias dopaminérgicas ilustradas na figura 7.



**Figura 7:** Exemplo das vias inibitórias e facilitatórias dopaminérgicas. Abreviaturas: NA, noradrenalina; ENC, encefalina; GABA, ácido  $\gamma$ -amino butírico; ININ, interneurônio inibitório; GRD, gânglio da raiz de projeção; NP, neurônio de projeção; FAP, fibra aferente primária (adaptado de Millan, 2002).

## 2.5 Vias Colinérgicas:

Numerosos estudos têm indicado um papel do sistema colinérgico central na nocicepção e no mecanismo de ação dos opióides, ou que poderia estar atuando em vias monoaminérgicas (Bartolini et al., 1987; 1992; Fürst, 1999). A acetilcolina (ACh) modula a nocicepção por um padrão complexo de efeitos, mediado via múltiplas classes de receptores, incluindo muscarínicos e nicotínicos. Os receptores  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  estão positivamente acoplados a proteína  $G_{q/11}$ , aumentando a atividade da PLC e AC, enquanto que os receptores  $M_2$  e  $M_4$  são acoplados a proteína  $G_{i/o}$ , refletindo na supressão da atividade da AC e das correntes de  $Ca^{+2}$ , e ainda, os receptores  $M_2$  ativam os canais de  $K^+$  (Millan, 2002).

Em contrapartida, os receptores nicotínicos são canais ionotrópicos (permeáveis a cátions), pentaméricos e apresentam-se na forma de 17 subtipos diferentes. A atividade antinociceptiva da acetilcolina no corno dorsal predominantemente envolve mecanismos muscarínicos. Tem sido descrito na literatura que os receptores  $M_2$  e  $M_4$  são responsáveis por estes efeitos (Gualtieri et al., 1989; Wess et al., 2003). Também é importante salientar que a administração de agonistas dos receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos em nível espinhal e a ativação supra-espinhal de receptores opióides do tipo  $\mu$ , aumentam a liberação de Ach no corno dorsal. Também foi sugerido que os receptores  $M_2$  tenham um papel antinociceptivo na periferia. Assim como os receptores muscarínicos, a ativação dos receptores nicotínicos pode contribuir para as ações antinociceptivas dos agonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos no corno dorsal. Além disso, podem interagir com terminais serotoninérgicos e adrenérgicos, também proporcionando antinocicepção (Millan, 2002).

## **2.6 Vias Óxido Nitrérgicas:**

Em vários nervos periféricos, no corno dorsal e possivelmente em outras partes do SNC, o óxido nítrico (NO) é formado pré-sinápticamente e atua como um transmissor do tipo não noradrenérgico-não colinérgico. Ele está implicado no controle do desenvolvimento neuronal, na plasticidade sináptica no SNC, no apetite e na nocicepção (Fürst, 1999). O NO neuronal e o não neuronal apresentam um papel importante na modulação da resposta nociceptiva em vários níveis, atuando por mediar a sensibilização de neurônios do corno dorsal, além de participar de mecanismos facilitatórios glutamatérgicos (VDE glutamatérgica) desencadeados por processos inflamatórios (Fürst, 1999; Millan, 2002).

Tem sido descrito que inibidores da óxido nítrico sintase (NOs) produzem efeito antinociceptivo em camundongos, sugerindo também um papel importante do NO no processamento da dor na medula espinhal (Meller e Gebhart, 1993). Porém, o NO pode interagir com as VDIs noradrenérgicas, opioidérgicas,

serotoninérgicas, colinérgicas, ou outros transmissores responsáveis pelo controle descendente inibitório, resultando em antinocicepção (Fürst, 1999; Millan, 1999).

Existem outras contradições sobre o verdadeiro papel do óxido nítrico na nocicepção. Em seus experimentos Meller e Gebhart (1993) constataram que a hiperalgesia térmica requer a ativação de receptores NMDA na medula, mediada pelo NO, enquanto que a hiperalgesia mecânica requer a coativação de receptores AMPA e metabotrópicos medidos por produtos da ciclooxigenase. Por outro lado, Ferreira (1993, 1995) constatou que a estimulação do sistema L-Arginina/NO/GMPc, por outro lado, promove a regulação decrescente dos nociceptores, promovendo analgesia.

## **2.7 Vias GABAérgicas:**

O GABA esta presente em níveis supra-espinhais, regulando os controles descendentes, suas próprias vias e outros neurônios do corno dorsal. Ele também é um neurotransmissor inibitório na modulação do processo nociceptivo (Hui et al., 2003). Os receptores GABA<sub>A</sub> compreendem um canal iônico pentamérico, formando um grupo de 18 diferentes sub-tipos. Entretanto, eles podem ser distinguidos pelas suas permeabilidades a ânions subjacentes à uma influência inibitória sobre a excitabilidade celular.

Os receptores GABA<sub>B</sub> são heterodímeros acoplados à proteína G<sub>i/o</sub>, sendo que sua ativação aumenta as correntes de K<sup>+</sup> e suprime as correntes de Ca<sup>+2</sup>, geralmente inibindo a AC, provocando uma redução na atividade neuronal (Fürst, 1999; Charles et al., 2001). Um terceiro tipo de receptores GABA (GABA<sub>C</sub>) também já foi identificado, mas ele parece não participar do controle da nocicepção (Hui, 2003).

Pela ação em seus receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, os interneurônios inibitórios apresentam um papel crítico e bem estabelecido no processo

antinociceptivo na medula espinhal e núcleo trigeminal, suprimindo excessivas excitações dos circuitos nociceptivos no tálamo e córtex cerebral, tanto em dores crônicas como agudas (Millan, 1999). Ilustrando, ainda, a complexidade e multiplicidade dos papéis dos neurônios GABAérgicos, eles atenuam a liberação de outros neurônios aferentes primários (serotoninérgicos), via receptor GABA<sub>B</sub>. Estas ações podem ser a base das ações antinociceptivas de agonistas GABAérgicos, como o baclofeno (Fürst, 1999; Millan, 2002). Os interneurônios inibitórios GABAérgicos apresentam ainda padrões de co-localização com outros neurotransmissores envolvidos com a resposta nociceptiva, são exemplos disso: co-localização com receptores colinérgicos, opióides e glicinérgicos, que é outro importante neurotransmissor inibitório (Millan, 2002).

## **2.8 Vias Opioidérgicas:**

Os peptídeos opióides são formados a partir de distintas proteínas precursoras ou pró-hormônios, que levam à formação de novos peptídeos, aumentando o número de componentes das famílias de peptídeos opióides conhecidas, bem como subsequente conhecimento de suas localizações e de seus papéis na modulação do processo nociceptivo (Millan, 2002).

Entre os peptídeos opióides, podemos citar as encefalinas, endomorfina,  $\beta$ -endorfinas, melanocortinas, nociceptina e nocistatina. As encefalinas medeiam suas ações na PAG e amígdala via receptor  $\delta$ , as dinorfina via receptor  $\kappa$  e as  $\beta$ -endorfinas via receptor  $\mu$ , levando a conclusão que o mecanismo de ação destes peptídeos é via VDI (Fürst, 1999).

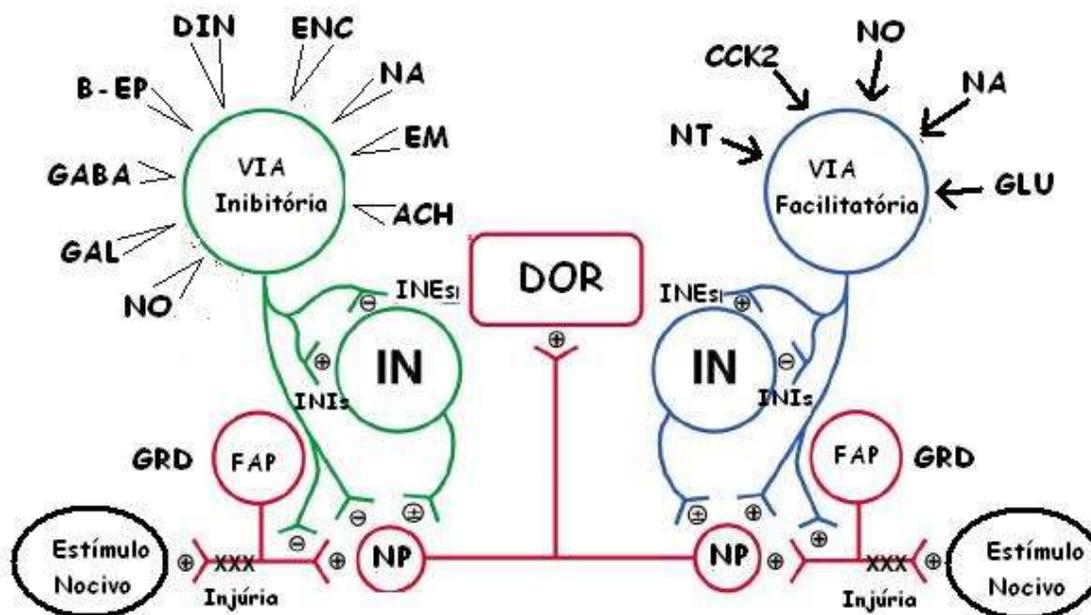
As endomorfina, por sua vez, apresentam alta afinidade e seletividade para os receptores  $\mu$  opióides, de localizações supraespinhais, como a PAG e amígdala, apresentando importante papel na modulação do controle descendente da dor (Millan, 2002). Em adição a estes fatos, as ações antinociceptivas dos peptídeos opióides podem ser por mecanismos indiretos.

Existem relatos sobre interação entre as vias encefalinérgicas e dopaminérgicas (Michael-Titus et al., 1990) e GABAérgicas (Hui et al., 2003; Lee et al., 2003) na promoção da ação antinociceptiva (Castro, 2000).

Existem três tipos majoritários de receptores opióides. Eles são os receptores  $\mu$  ( $\mu$ ), kappa ( $\kappa$ ) e delta ( $\delta$ ) (Todd e Spike, 1993; Coggeshal e Carlton, 1997). Eles estão localizados em vários níveis nas vias de transmissão da dor, como por exemplo, no corno dorsal, mesencéfalo e tálamo, e tem sido associado com analgesia espinhal e supra-espinhal. Existem dois subtipos de receptores  $\mu$ , um responsável pela atividade antinociceptiva ( $\mu_1$ ) e outro ( $\mu_2$ ) responsável pela depressão respiratória induzida por agonistas  $\mu$ ; os receptores  $\kappa$  estão amplamente presentes nas mesmas áreas que o receptor  $\mu$ . Quando ativado, ele produz analgesia em nível espinhal. Os receptores  $\delta$  são geralmente encontrados em toda parte do neuro-eixo (Fürst, 1999). Estes receptores apresentam um padrão homogêneo de mecanismo de transdução: todos são negativamente acoplados a AC e aumentam as correntes de  $K^+$  e suprimem as correntes de  $Ca^{+2}$ , estas ações são responsáveis por suas atividades inibitórias sobre a excitabilidade neuronal. Estes receptores podem ser encontrados co-localizados em um simples neurônio. Isto é importante, pois foram observadas interações entre os receptores opióides, incluindo a constituição de heterodímeros que apresentam características diferentes dos monômeros equivalentes (Przewocki e Przewoca, 2001; Millan, 2002).

Atuando de maneira diferente, encontramos a nociceptina. Este peptídeo composto de 17 aminoácidos, também chamado de orfanina Q, apresenta suas atividades através de sua atuação em receptores opióides tipo 1 (ORL<sub>1</sub>), também chamado de receptor NOP. Assim como os outros peptídeos e receptores opióides, a nociceptina e seu receptor NOP, também estão envolvidos no processamento da nocicepção em regiões do SNC. Autores têm demonstrado que a nociceptina (em baixas doses) apresenta um papel pronociceptivo no corno dorsal da medula espinhal, possivelmente por atuar interagindo com outros

transmissores como o GLU e SP liberado nas FAPs e prostaglandinas atuando nos INIs. Já em regiões supra-espinhais, a nociceptina parece exercer uma influência inibitória sobre processos antinociceptivos (Millan, 2002). Substâncias participantes das vias inibitórias e facilitatórias no processo nociceptivo, ilustradas na figura 8.



**Figura 8:** Exemplos de mecanismos envolvendo as vias descendentes inibitória e facilitatória. Abreviaturas: Ach, acetilcolina; EM, endomorfinina; ENC, encefalina; DIN, dinorfina; B-EP, β- endorfina; GABA, ácido γ-amino butírico; GAL, galanina; NO, óxido nítrico; NT, neurotensina; CCK2, colicistocinina; NA, noradrenalina; GLU, glutamato; NP, neurônio de projeção; IN, interneurônio; FAP, fibra aferente primária; GRD, gânglio da raiz dorsal; INIs, inter neurônios inibitórios, INEs, interneurônios excitatórios (adaptação de Millan, 2002).

### *3. Proposição*

\* Avaliar a atividade antinociceptiva do EB das sementes da *Pterodon pubescens* Benth.;

\*Avaliar a atividade antinociceptiva das frações obtidas do EB das sementes da *Pterodon pubescens* Benth.

\* Determinar as frações ativas e identificar os compostos presentes.

## *4. Material e Métodos*

## **4.1 MATERIAL**

### **4.1.1 Drogas**

Indometacina; morfina (Cristália- Brasil) ; capsaicina (Sigma Chemical Co- USA), hidrocloreto de naloxona (Sigma Chemical Co- USA). Todas as drogas foram solubilizadas em solução salina (NaCl 0,9%), juntamente com 0,5% de Tween 80<sup>®</sup>.

### **4.1.2 Solventes e Reagentes**

Formaldeído (Chemco- Brasil), Tween 80<sup>®</sup> (Labsynth- Brasil), cloreto de sódio (Labsynth- Brasil), ácido acético glacial (Chemco- Brasil), diclorometano, acetato de etila (Chemco), anidrido acético (Merck, Alemanha), solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído [50:1:0,5] ) e hexano (Chemco). Todos os solventes e reagentes utilizados foram P.A. Quando necessário, os solventes foram destilados e tratados conforme descrito por Morita e Assumpção (1986).

### **4.1.3 Material Vegetal**

As sementes da *Pterodon pubescens* Benth. foram coletadas nos municípios de Pedregulho (SP) e São Carlos (SP), em março de 2004, sob a supervisão do Prof. Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do departamento de Botânica do IB-UNICAMP. As exsiccatas (1398 e 1402) foram depositadas no *Herbarium* da Universidade Estadual de Campinas (UEC) do IB-UNICAMP.

#### **4.1.4 Animais**

Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libidum*. Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos, adultos (25-35g), aclimatados às condições do laboratório por 7 dias, sendo agrupados ao acaso, em grupos de até 10 animais e submetidos a jejum de 12 horas. Todos os experimentos foram conduzidos com aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal do IB-UNICAMP, sob protocolo numero 766-1 (anexo 1). Foram adotadas boas práticas de manutenção e tratamento dos animais conforme as normas descritas pelo NIH (1996) e CIOMS (1985).

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Estudo Fitoquímico**

##### **4.2.1.1 Extração**

Sementes da *Pterodon pubescens* Benth. moídas com gelo seco em moinho de facas (Stephen modelo UM40), foram extraídos utilizando diclorometano como solvente extrator, três vezes, em períodos de uma hora e meia cada, na proporção de 5:1 (solvente: material vegetal). O extrato foi seco sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrado e concentrado em rotaevaporador Buchi RE 120, fornecendo o óleo das sementes denominado extrato bruto (EB).

#### **4.2.1.2 Métodos Cromatográficos :**

##### **4.2.1.2.1 Cromatografia em Coluna Filtrante**

As cromatografias em coluna filtrante foram realizadas utilizando suporte de vidro com placa porosa, fase estacionária com Silicagel 60<sup>®</sup> (Merck, 0,063- 0,200 mm) numa proporção de 1:3 (amostra: sílicagel). Utilizou-se gradientes de hexano, acetato de etila e metanol para as fase móveis.

##### **4.2.1.2.2 Cromatografia em Coluna Clássica**

As cromatografias em coluna clássica foram efetuadas em suporte de vidro recheado com Silicagel 60<sup>®</sup> (Merck, 0,063- 0,200 mm). Foi utilizada uma proporção de 1:30 (amostra: silicagel) para a montagem da coluna; quando necessária uma purificação mais refinada, esta proporção foi aumentada para 100 vezes.

##### **4.2.1.2.3 Cromatografia em Camada Delgada**

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas prontas (Merck<sup>®</sup> artigo 5554). A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada UV a 254nm, com posterior pulverização com solução ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído (50: 1: 0,5), seguido de aquecimento em estufa a 100°C durante 5 minutos.

##### **4.2.1.2.4 Análise Qualitativa por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas**

As frações e substâncias puras foram diluídas em acetato de etila ou metanol e analisadas por cromatografia gasosa capilar acoplada a um detector de massas (CG Hewlett Packard 5890, série II, diretamente acoplado a um detector

seletivo de massa Hewlett Packard 5970, equipado com uma coluna de sílica fundida WCOT, 30 m x 0.25 mm, DB-1 ou DB-5, ou similares). As condições para análise foram: temperatura de injetor e detector 250°C; forno 110°C (2min)/ 2°C/min/ 300°C (10 min).

### **4.2.2 Avaliação Farmacológica**

#### **4.2.2.1 Avaliação Hipocrática**

Grupos experimentais de 2 camundongos (*Swiss*) foram tratados pela via intraperitoneal (i.p.) com solução de NaCl 0,9%, morfina (10 mg/kg) e com o extrato bruto (EB) da *P. pubescens* Benth. nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg. Foram então colocados em uma caixa para que se pudesse avaliar as condições gerais dos animais durante um período de 3 horas.

#### **4.2.2.2 Atividade Antinociceptiva**

##### **4.2.2.2.1 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Grupos experimentais de até 8 camundongos (*Swiss*), em jejum de 12 horas foram tratados com solução salina 0,9%, indometacina (10 mg/kg), EB da *P. pubescens* Benth. bem como suas frações (doses variadas) via oral. Após uma hora, os animais receberam ácido acético (0,8% 0,1 mL/ 10g, i.p.). As contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas, foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção (Koster et al., 1959; Vacher et al., 1964).

#### **4.2.2.2.2 Teste de algesia induzida por calor (Placa quente)**

Foram utilizados grupos de até 8 camundongos (*Swiss*) submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados pela via oral com solução de NaCl 0,9%, morfina (10 mg/kg) controle positivo e com o EB da *P. pubescens* Benth. e suas frações nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, trinta minutos antes da administração do estímulo álgico. Após 30, 60, 90 e 120 minutos desta administração, os animais foram submetidos ao estímulo álgico em placa quente com temperatura controlada de  $56 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , até que apresentasse o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras) sendo anotado o tempo de reação dos animais com uso de cronômetro acoplado a placa quente. Para este teste, os camundongos foram previamente submetidos ao estímulo álgico (24h antes) a fim de selecionar os animais mais responsivos.

#### **4.2.2.2.3 Teste de algesia induzida por Formalina**

Foram utilizados grupos de até 8 camundongos (*Swiss*) submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados pela via oral com solução de NaCl 0,9%, morfina (10 mg/kg), indometacina (30 mg/kg) e com extrato bruto (EB) da *Pterodon pubescens* pela via oral. Após 60 minutos, foi administrada uma solução de formalina na concentração de 2% (formaldeído 1,2% em PBS) por via intraplantar (20  $\mu\text{L}$ / pata) na pata posterior direita dos animais. O tempo que os animais permaneceram lambendo as patas, durante um período de 45 minutos, foi indicativo de nocicepção. Os primeiros cinco minutos determinam resposta à dor de origem neurogênica; dos 25-45 minutos, determinam resposta a dor de origem inflamatória.

#### **4.2.2.2.4 Teste de algesia induzida por capsaicina**

Foram utilizados grupos de até 8 camundongos (*Swiss*) submetidos a jejum de 12 horas. Os animais foram tratados pela via oral com solução de NaCl 0,9%, morfina (10 mg/kg), e com as frações do óleo das sementes da *P. pubescens* Benth. (300 mg/kg). Após 60 minutos, foi administrada uma solução de capsaicina (50 µL/pata) na pata posterior direita dos animais. O tempo que os animais permaneceram lambendo as patas, por um período de cinco minutos, foi indicativo de nocicepção. Este teste é semelhante ao da formalina, contudo, só avalia dor de origem neurogênica.

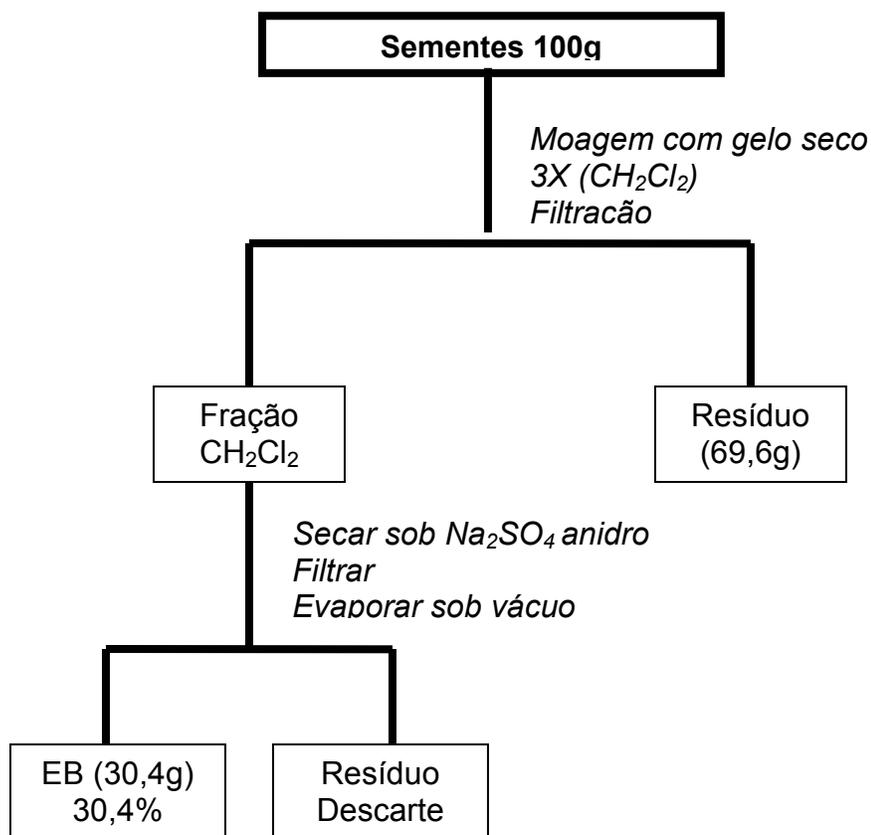
### **4.3 Análise Estatística**

Todos os resultados foram submetidos a análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico  $p < 0,05$  para que seja considerados diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguidos do Teste de Duncan, utilizando o software StatSoft.

## *5. Resultados*

**5.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO (EB)**

Para dar início ao trabalho de avaliação da atividade antinociceptiva da *P. pubescens* Benth., foi feita a extração do óleo das sementes (EB), utilizando diclorometano como solvente extrator, seguindo procedimento descrito na figura 9:



**Figura 9:** Fluxograma de extração do óleo das sementes da *P. pubescens* Benth. (EB), utilizando diclorometano como solvente extrator.

## 5.2 ENSAIOS COM EXTRATO BRUTO (EB)

### 5.2.1 Ensaio Hipocrático:

Foram utilizados dois animais por grupo (6 grupos), para avaliar as condições gerais, tais como, atividade motora, resposta reflexa, estímulo ou depressão, dentre outros. Aos grupos, foram administradas solução salina (controle), morfina (controle) e EB nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, via intraperitoneal. Após o tratamento, os animais foram colocados juntos em uma caixa, para avaliação por um período de três horas. A tabela contida na figura 10, descreve os parâmetros avaliados neste ensaio.

**Tabela 1:** Parâmetros avaliados durante ensaio hipocrático. Legenda: N - resposta normal; ↑ - resposta aumentada; ↓ - resposta diminuída

		Salina 10mL/kg	Morfina 30mg/kg	EB 30mg/kg	EB 100mg/kg	EB 300mg/kg	EB 1000mg/kg
<b>Estado de consciência e disposição</b>	Aparência Geral	N	↓	N	N	N	N
	Frênico Vocal	N	↑	N	N	N	N
<b>Sistema Motor</b>	Resposta a aperto da cauda	N	↓	N	N	N	N
<b>Tono Muscular</b>	Força para agarrar	N	↓	N	N	N	N
<b>Atividade do SNC</b>	Straub	N	↑	N	N	N	N
<b>Atividade autônoma</b>	Piloereção	N	↑	N	N	N	N

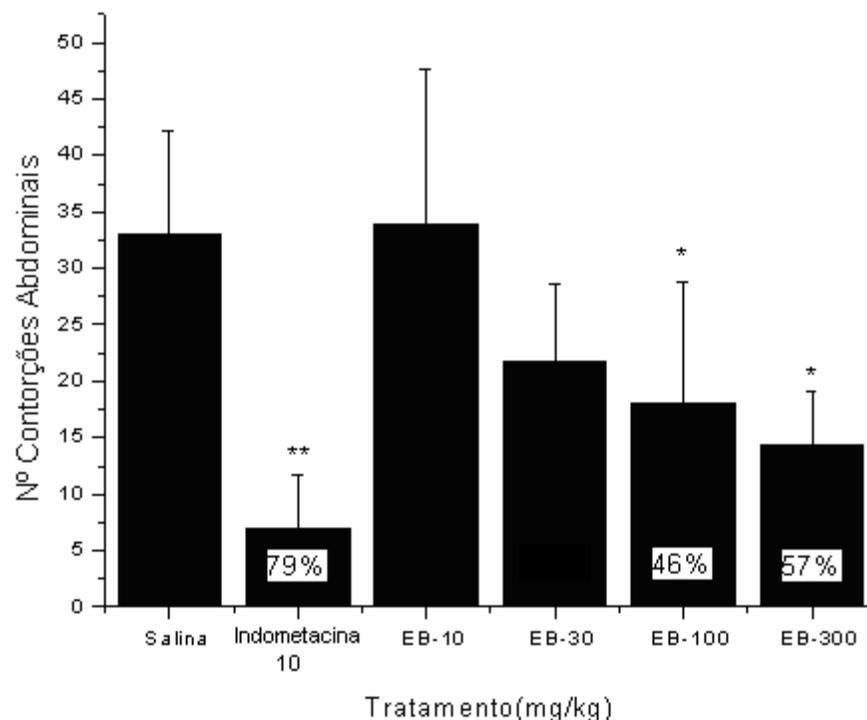
O grupo controle morfina, apresentou várias características próprias do uso de opióides, tais como, não resposta a frênico vocal, não resposta reflexa por aperto da cauda, diminuída força, fenômeno de Straub (ereção da cauda) acentuado e piloereção. Em todos os outros grupos, os animais permaneceram com suas respostas normais.

Para avaliar a atividade antinociceptiva do EB, utilizaram-se 3 ensaios farmacológicos de algia: *contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da placa quente e teste da formalina.*

### **5.2.2 Contorções Abdominais Induzidas Por Ácido Acético:**

#### **5.2.2.1 Curva dose-resposta do EB**

No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10 mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $33 \pm 9$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com o EB das sementes da *P. pubescens*, nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, demonstrou reduzir o número de contorções abdominais em 46% ( $18 \pm 10$ ) e 57% ( $14 \pm 4$ ), respectivamente. A indometacina, controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 79% ( $7 \pm 4$ ). Os resultados estão representados no gráfico 1.



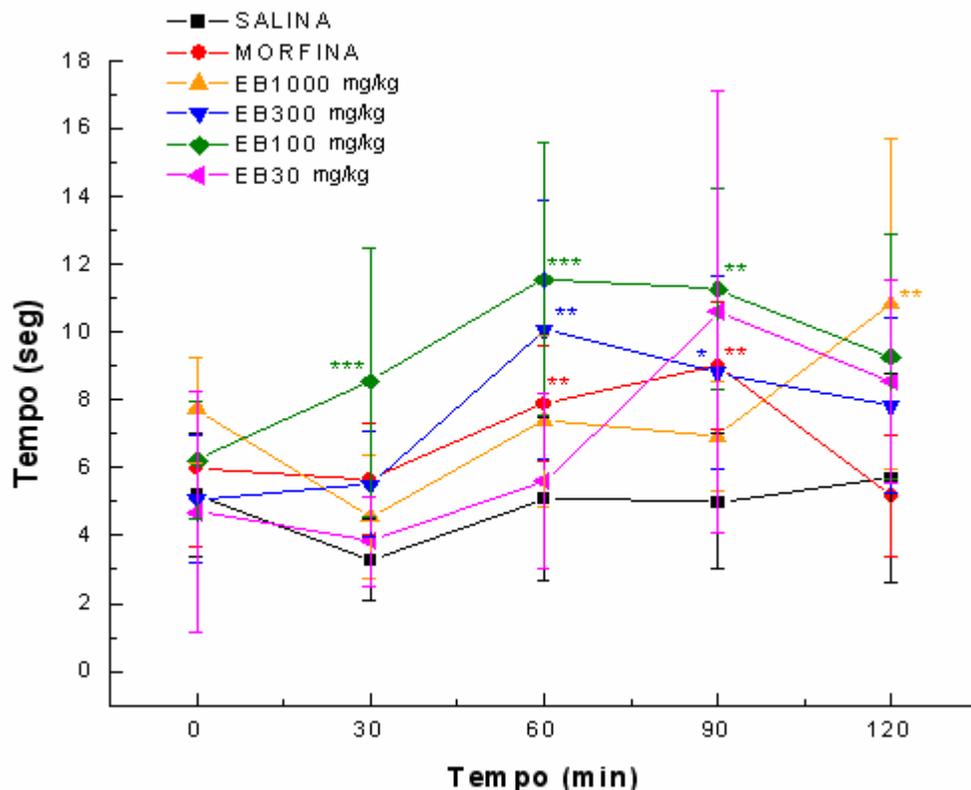
**Gráfico 1:** Contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10mL/kg), indometacina (10mg/kg) e extrato bruto das sementes da *P. pubescens* nas doses de 10, 30, 100 e 300 mg/kg. Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de até 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(5,42)} = 6,01$  \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### 5.2.3 Teste Da Placa Quente:

#### 5.2.3.1 Curva dose –resposta do EB

Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste. O Extrato Bruto (EB) da *Pterodon pubescens* Benth. nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo algico térmico ( $56,5 \pm 0,1$  °C) em 260% (EB 100mg/kg após 30 minutos); 226% e 197% (EB 100 mg/kg e EB 300 mg/kg após 60 minutos); 225% e 178% (EB 100 mg/kg e EB 300 mg/kg após 90 minutos). A morfina (20 mg/kg)

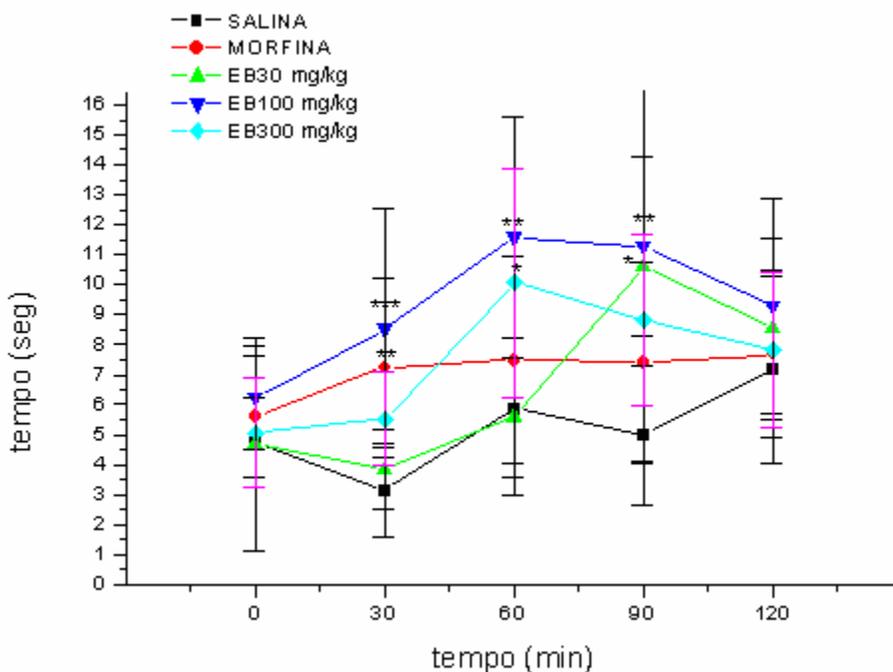
aumentou o tempo de reação dos animais em 146% e 148% após 60 e 90 minutos respectivamente. Resultados demonstrados no gráfico 2.



**Gráfico 2:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10mL/kg), morfina e EB da *P. pubescens* Benth. nas dose de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de até 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(5,42)} = 1,89$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(5,42)} = 7,22$   $p < 0,001$ ; 60 min:  $F_{(5,42)} = 5,91$   $p < 0,001$ ; 90 min:  $F_{(5,42)} = 4,49$   $p < 0,01$ ; 120 min:  $F_{(5,42)} = 2,47$   $p < 0,05$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

5.2.3.2 Curva dose-resposta EB

Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste. O EB da *P. pubescens* Benth. nas dose de 30, 100 e 300 mg/kg , foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo álgico térmico ( $56,5 \pm 0,1$  °C) em 271% (EB 100 mg/kg após 30 minutos), 195% e 171% (EB 100 mg/kg e EB 300 mg/kg após 60 minutos), 212% e 225% (EB 30 mg/kg e EB 100 mg/kg após 90 minutos). A morfina (20 mg/kg) aumentou o tempo de reação dos animais em 230 % após 30 minutos. Resultados demonstrados no gráfico 3.

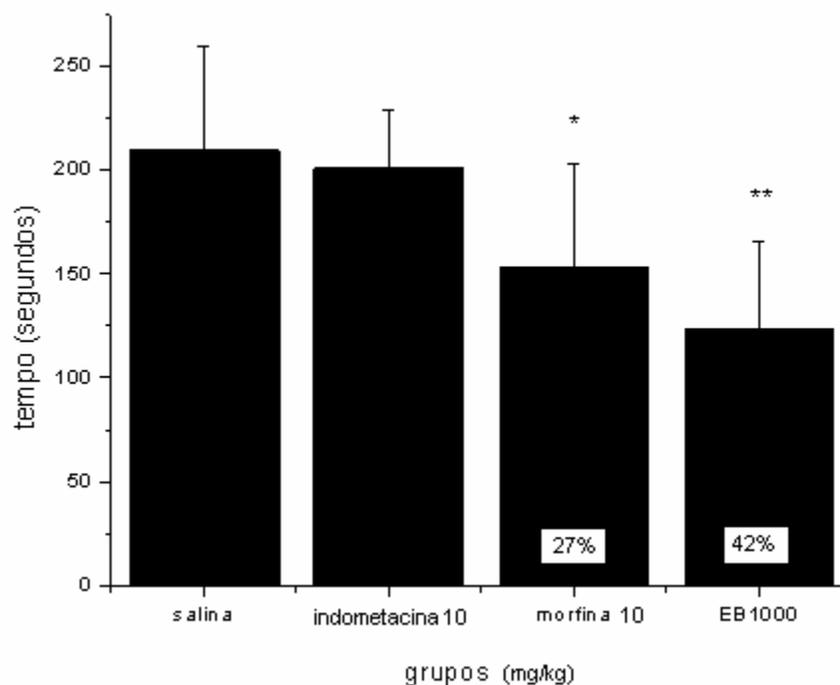


**Gráfico 3:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10mL/kg), morfina e EB da *P. pubescens* Benth. nas dose de 30, 100 e 300 mg/kg. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de até 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(4,34)} = 0,62$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(4,34)} = 6,13$   $p < 0,001$ ; 60 min:  $F_{(4,34)} = 4,79$   $p < 0,01$ ; 90 min:  $F_{(4,34)} = 3,07$   $p < 0,05$ ; 120 min:  $F_{(4,34)} = 0,55$   $p > 0,05$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**5.2.4 Teste Da Formalina:**

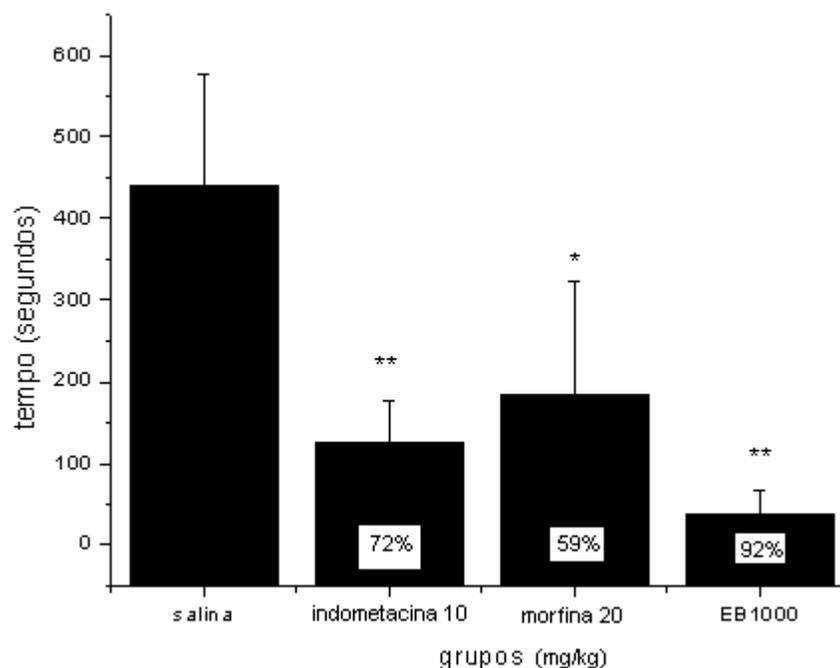
A injeção intraplantar de formalina (3% em salina, 20µL) na pata posterior de camundongos produziu intensa resposta nociceptiva em duas fases distintas: a primeira de 0 a 5 minutos (dor neurogênica) e a segunda de 25 a 45 minutos (dor inflamatória). Nos animais previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), a reatividade na primeira fase de nocicepção foi de  $211 \pm 50$  segundos e na segunda fase  $440 \pm 138$  segundos. A morfina (10 mg/kg), controle positivo, apresentou redução de 27% ( $153 \pm 50$ ) e 59% ( $184 \pm 140$ ) nas fases I e II respectivamente. A indometacina, controle positivo, reduziu em 4,2% ( $201 \pm 26$ ) e 72% ( $126 \pm 51$ ) a reatividade nas fases I e II respectivamente. O EB (1000 mg/kg) reduziu a reatividade em 42% ( $123 \pm 42$ ) na primeira fase e 92% ( $39 \pm 28$ ) na segunda fase do experimento. Os resultados estão demonstrados nos gráficos 4 e 5.

Teste da formalina *fase I* (0-5 minutos):



**Gráfico 4:** Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), morfina (20 mg/kg) e com EB das sementes da *P. pubescens* Benth. (1000 mg/kg). As colunas indicam as médias da fase I (0 a 5 minutos – dor neurogênica) ± desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(3,28)} = 5,17$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

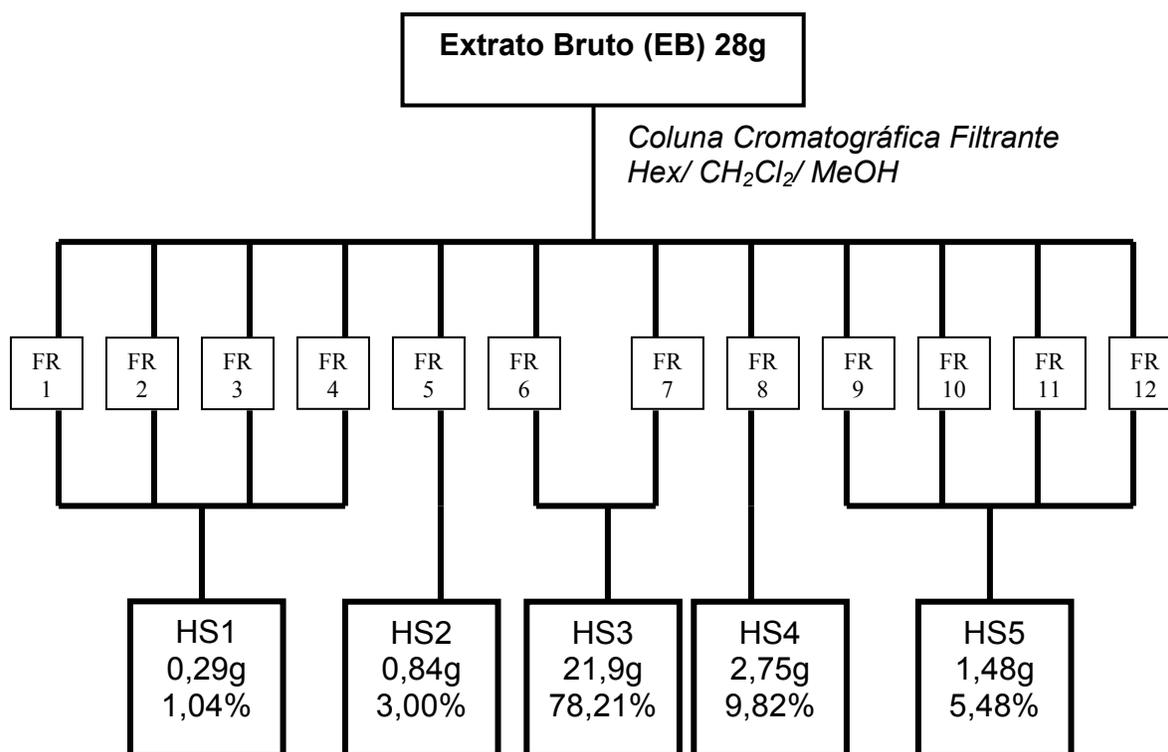
Teste da formalina fase II (25-45 minutos):



**Gráfico 5:** Reatividade a aplicação intraplantar de formalina na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), morfina (20 mg/kg) e com EB das sementes da *P. pubescens* Benth. (1000 mg/kg). As colunas indicam as médias da fase II (25 a 45 minutos - dor inflamatória) ± desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(3,28)} = 13,22$  \* $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ ).

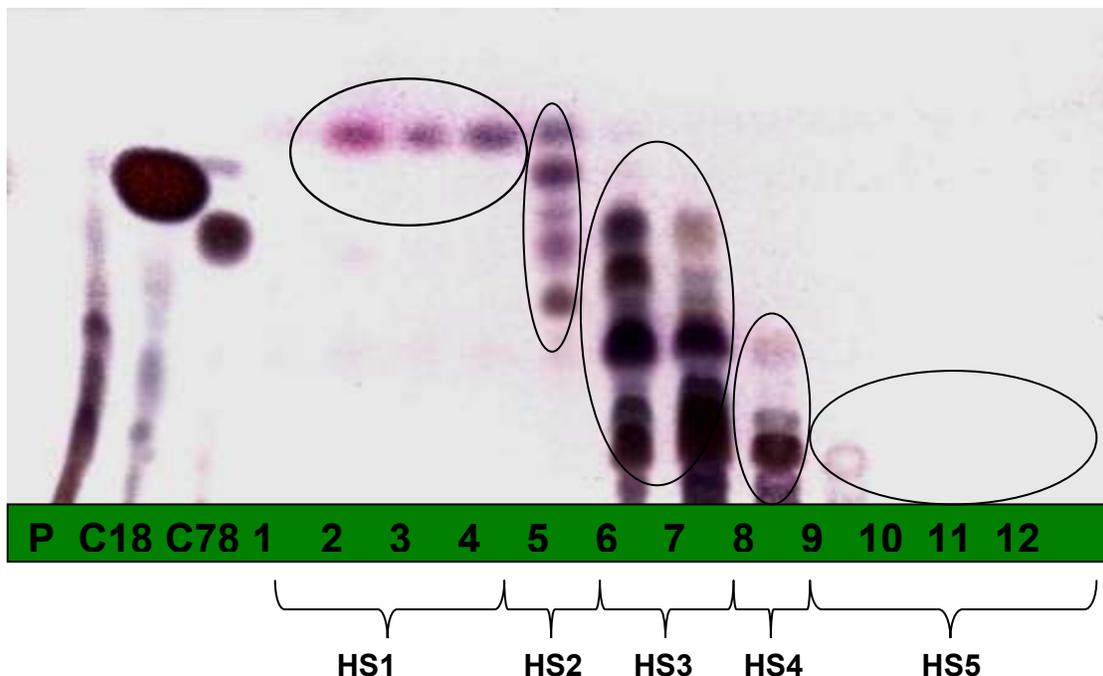
## 5.3 FRACIONAMENTO I

Demonstrada a ação antinociceptiva do EB, este foi pré-purificado por coluna filtrante, fornecendo 12 frações, que foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico observado por cromatografia em camada delgada utilizando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (99:1) para eluir, resultando em 5 frações, HS1, HS2, HS3, HS4 e HS5, descritas no fluxograma da figura 11, que foram testadas no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Total de rendimento: **97,4%**.

**Figura 10:** Fluxograma do fracionamento do EB da *P. pubescens* Benth. obtido por coluna cromatográfica filtrante utilizando fase estacionária Silicagel 60<sup>®</sup> e fase móvel gradientes de hexano/ diclorometano.



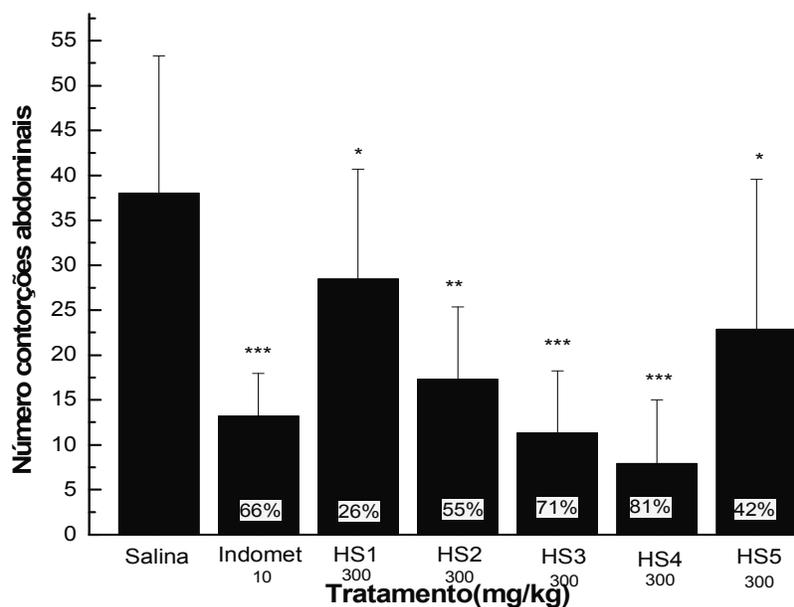
**Figura 11:** Cromatografia em camada delgada (CCD) das frações resultantes da coluna cromatográfica filtrante do EB obtidas das sementes da *P. pubescens* Benth. utilizando uma mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : metanol (99:1) para eluir e revelado com reagente de anisaldeído seguido de aquecimento. (P – fração com atividade antiinflamatória; C18-  $7\beta$ -acetoxivouacapano e C78 –  $6\alpha$ ,  $7\beta$ -diacetoxivouacapano).

#### 5.4 ENSAIOS COM AS FRAÇÕES RESULTANTES DO FRACIONAMENTO I:

##### 5.4.1 Contorções Abdominais Induzidas Por Ácido Acético

5.4.1.1 Avaliação das frações HS1, HS2, HS3, HS4 e HS5

No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10 mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $38 \pm 4$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com as frações HS1, HS2, HS3, HS4 e HS5 obtidas do EB das sementes da *P. pubescens* Benth., na dose de 300 mg/kg, demonstraram reduzir o número de contorções abdominais em 26% ( $28 \pm 12$ ), 55% ( $17 \pm 8$ ), 71% ( $11 \pm 7$ ), 81% ( $7,8 \pm 7$ ) e 42% ( $23 \pm 16$ ), respectivamente. A indometacina (10 mg/kg), controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 66% ( $13 \pm 4,8$ ). Os resultados estão representados no gráfico 6.



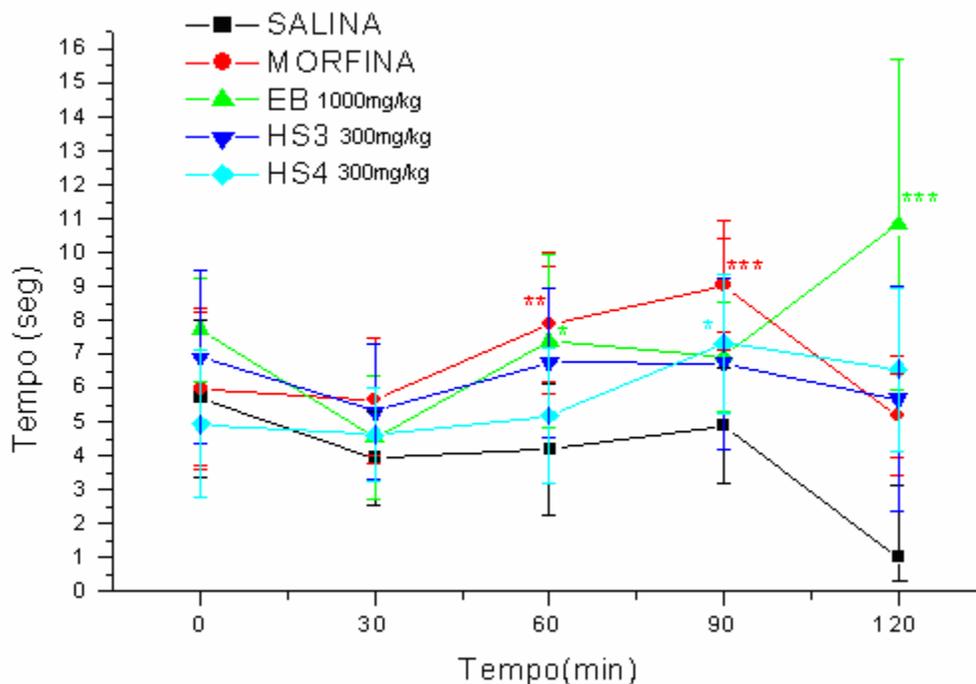
**Gráfico 6:** Contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg) e frações obtidas do EB das sementes da *P. pubescens* Benth. na dose de 300mg/kg. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(6,49)} = 6,41$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ).

A fração HS3 reduziu o número de contorções em 71% ( $11 \pm 7$ ) e a fração HS4 reduziu em 81% ( $7,8 \pm 7$ ), comparados ao controle positivo que reduziu o número de contorções em 66% ( $13 \pm 4,8$ ) demonstrando a maior atividade antinociceptiva entre as cinco frações testadas, portanto, foram selecionadas estas frações para dar continuidade ao trabalho.

### **5.4.2 Teste Da Placa Quente**

#### **5.4.2.1 Avaliação das frações HS3, HS4 e EB**

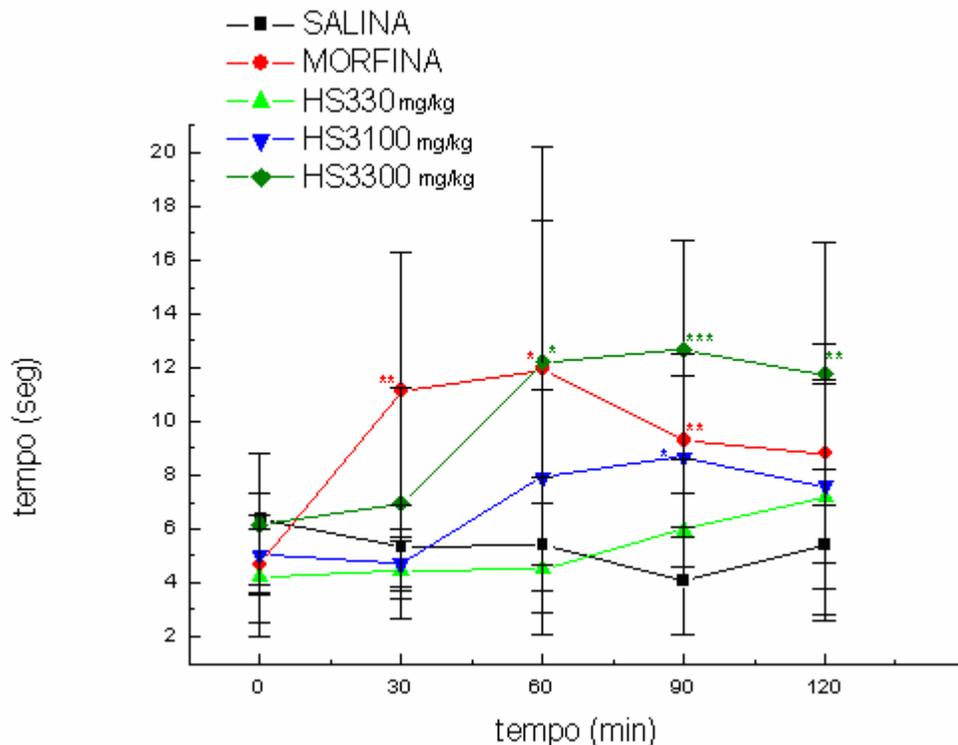
Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste. O EB da *Pterodon pubescens* Benth., as frações HS3 e HS4, foram capazes de aumentar o tempo de reação ao estímulo algico térmico ( $56,5 \pm 0,1$  °C) em 76,4% (EB 1000 mg/kg após 60 minutos), 165,19% (EB 1000 mg/kg após 120 minutos) e 46% (HS4 300 mg/kg após 90 minutos). A morfina (20 mg/kg) aumentou o tempo de reação dos animais em 188 % e 184 % após 60 e 90 minutos respectivamente. Resultados demonstrados no gráfico 7.



**Gráfico 7:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina, EB, fração HS3 e fração HS4 de sementes da *P. pubescens* Benth. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(4,35)} = 1,52$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(4,35)} = 0,88$   $p > 0,05$ ; 60 min:  $F_{(4,35)} = 4,61$   $p < 0,01$ ; 90 min:  $F_{(4,35)} = 4,8$   $p < 0,01$ ; 120 min:  $F_{(4,35)} = 5,10$   $p < 0,01$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 5.4.2.2 Curva dose-resposta fração HS3

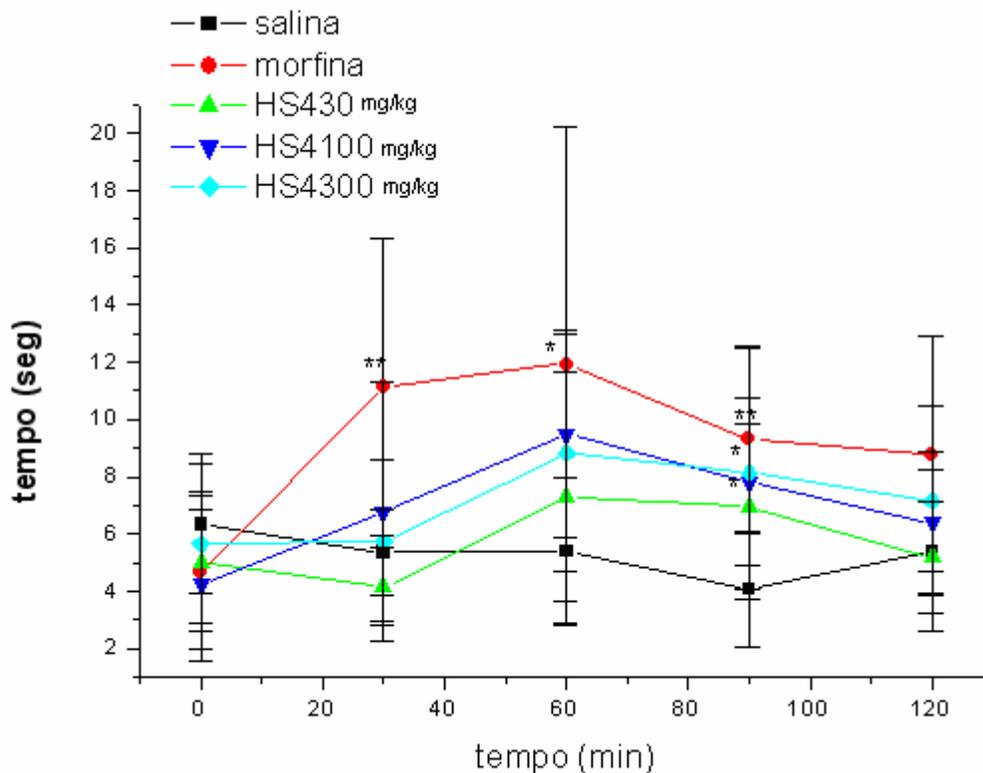
Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste. A fração HS3 da *P. pubescens* Benth. nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo álgico térmico ( $56,5 \pm 0,1$  °C) em 126% (HS3 300 mg/kg após 60 minutos); 111,3% e 211% (HS3 100 mg/kg e HS3 300 mg/kg após 90 minutos), 116% (HS3 300 mg/kg após 120 minutos). A morfina (20 mg/kg) aumentou o tempo de reação dos animais em 207%, 221%, 228% e 162% após 30, 60, 90 e 120 minutos respectivamente. Resultados demonstrados no gráfico 8.



**Gráfico 8:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina e a fração HS3 da *P. pubescens* Benth. nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(4,35)} = 0,88$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(4,35)} = 3,62$   $p < 0,01$ ; 60 min:  $F_{(4,35)} = 2,76$   $p < 0,05$ ; 90 min:  $F_{(4,35)} = 5,01$   $p < 0,001$ ; 120 min:  $F_{(4,35)} = 2,76$   $p < 0,05$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 5.4.2.3 Curva dose-resposta fração HS4

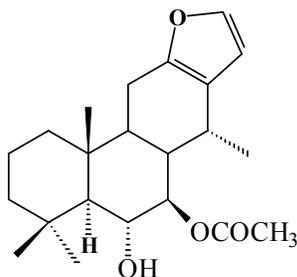
Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste. A fração HS4 da *P. pubescens* Benth. nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo algico térmico ( $56,5 \pm 0,1$  °C) em 92,3% e 100% (HS4 100 mg/kg e HS4 300 mg/kg após 90 minutos). A morfina (20 mg/kg) aumentou o tempo de reação dos animais em 207%, 221%, 228% e 162% após 30, 60, 90 e 120 minutos respectivamente. Resultados demonstrados no gráfico 9.



**Gráfico 9:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10mL/kg), morfina e a fração HS4 da *P. pubescens* nas doses de 30, 100 e 300mg/kg. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(4,35)} = 0,88$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(4,35)} = 3,62$   $p < 0,01$ ; 60 min:  $F_{(4,35)} = 2,76$   $p < 0,05$ ; 90 min:  $F_{(4,35)} = 5,01$   $p < 0,001$ ; 120 min:  $F_{(4,35)} = 2,76$   $p < 0,05$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

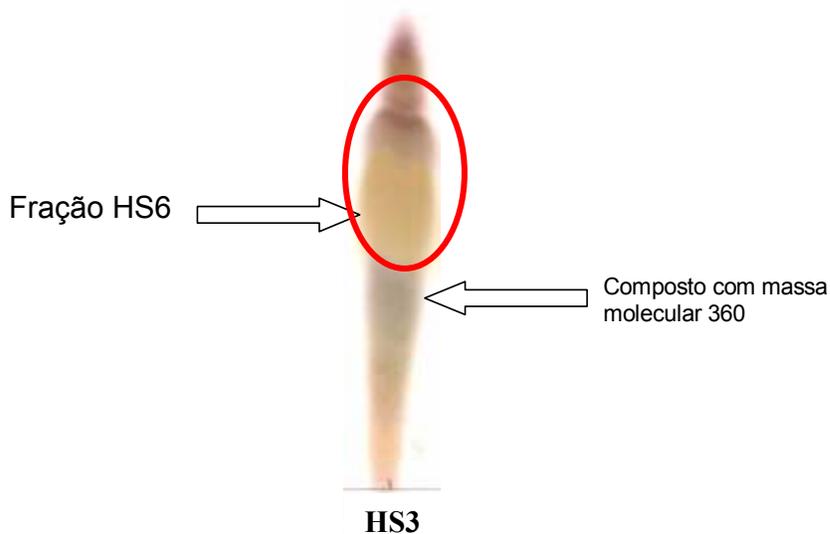
### 5.5 FRACIONAMENTO II

Trabalho realizado por Denny (2002), permitiu identificar o composto 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano (figura 12) como um dos componentes responsáveis pela atividade antiinflamatória do óleo da *P. pubescens* Benth.



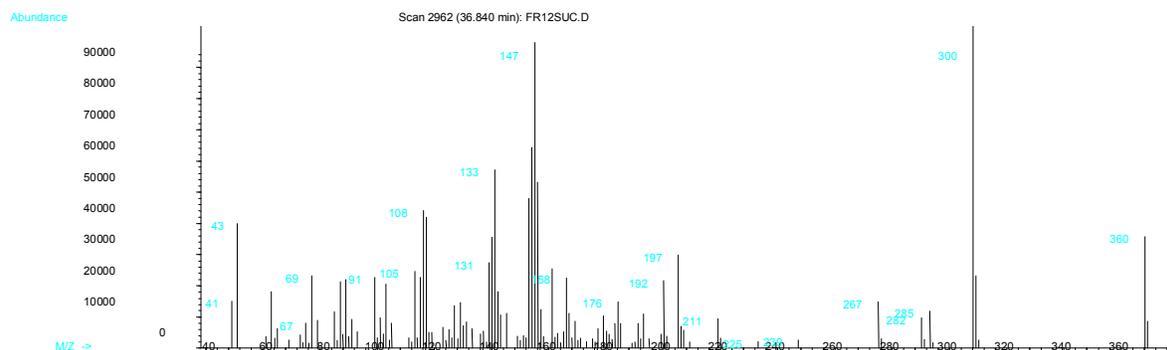
**Figura 12:** Estrutura molecular do composto 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano.

O perfil cromatográfico observado por CCD para a fração ativa HS3 (figura 13) demonstra a presença deste composto (íon molecular de 360 u.m.a.), bem como a presença de um composto majoritário. Demos seqüência na purificação da fração HS3 para isolar e testar esta fração nos modelos de nocicepção. Obteve-se a fração HS6, oriunda da fração HS3 sem a presença do composto 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano.



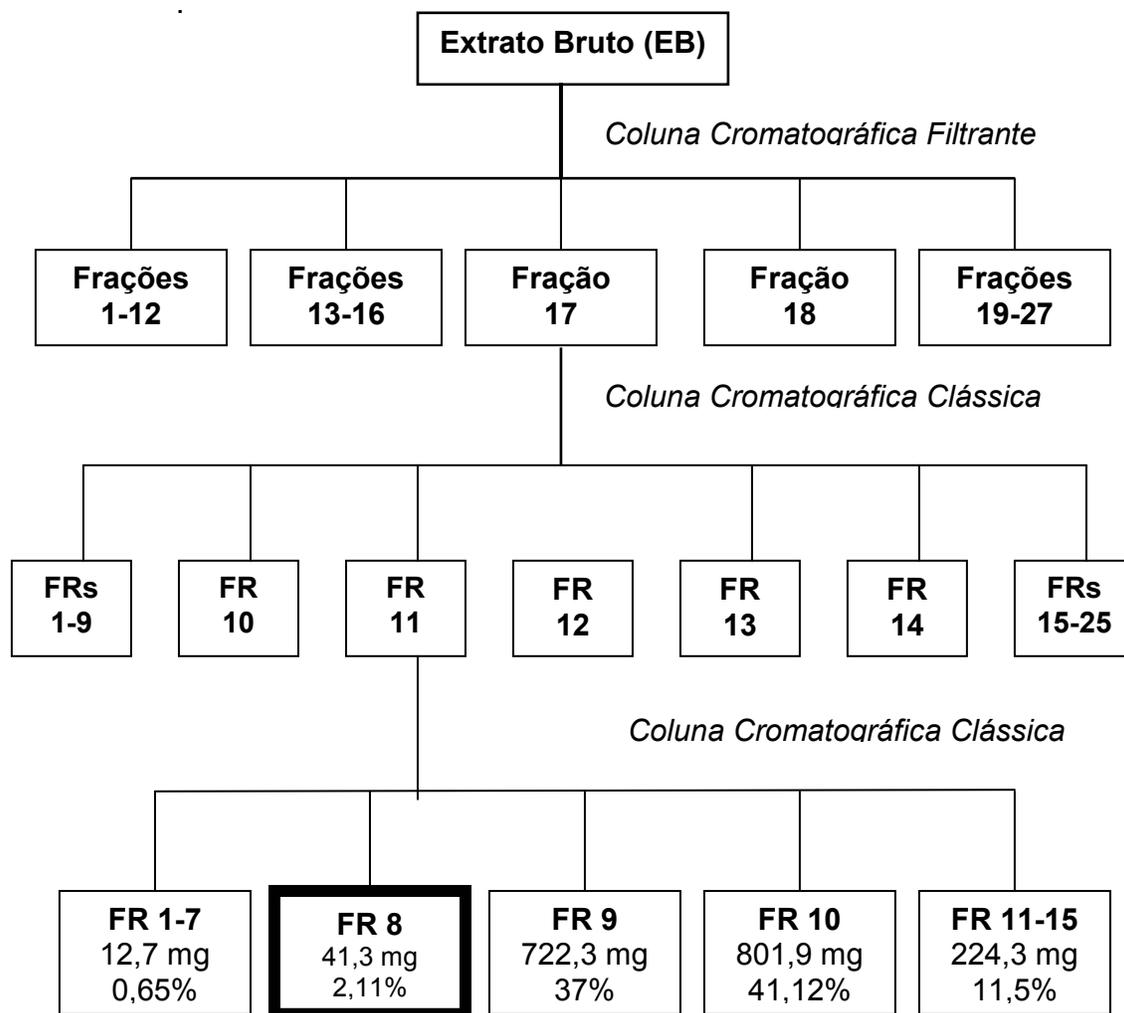
**Figura 13:** Perfil cromatográfico (CCD) da fração HS3, demonstrando presença dos composto com íon molecular 360 e fração HS6.

Identificou-se na fração **HS3**, o composto  $6\alpha$ -hidroxi,  $7\beta$ -acetoxivouacapano, como foi evidenciado no CG/EM – (HP-5890/ HP-5970) pelo íon molecular em 360 u.m.a. (figura 14), previamente estudado por Denny (2002).



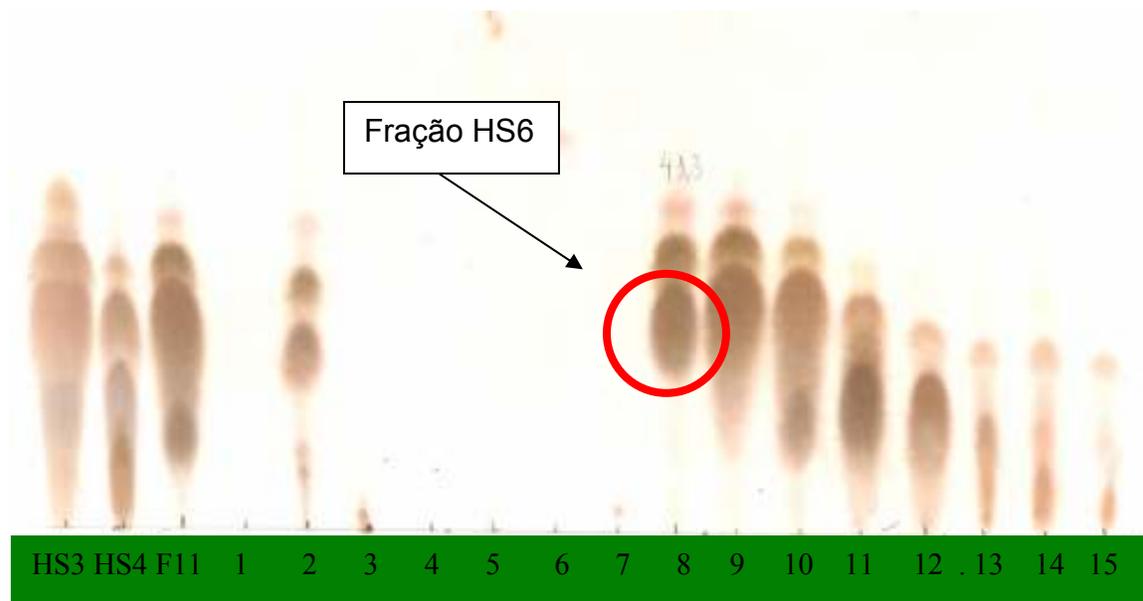
**Figura 14:** Fragmentograma da fração HS3 obtido por CG/EM – HP-5890/ HP-5970 com íon molecular 360 u.m.a., que apresentou atividade antiinflamatória em trabalho preliminar.

Foram realizadas diversas purificações a partir do EB (figura 15) por métodos cromatográficos até se obter quantidade suficiente da fração HS6 (220mg) para avaliação nos modelos de nocicepção para verificar se a ação antinociceptiva estaria relacionada a esta fração, de forma independente ao composto previamente identificado por Denny (2002). As figuras 15 e 16 representam a seqüência de fracionamentos para obtenção da fração HS6 e a CCD das frações resultantes respectivamente.



Rendimento total de purificação: **92,4%**.

**Figura 15:** Fluxograma do fracionamento do EB da *P. pubescens* Benth., através de métodos cromatográficos, para obtenção da fração HS6.



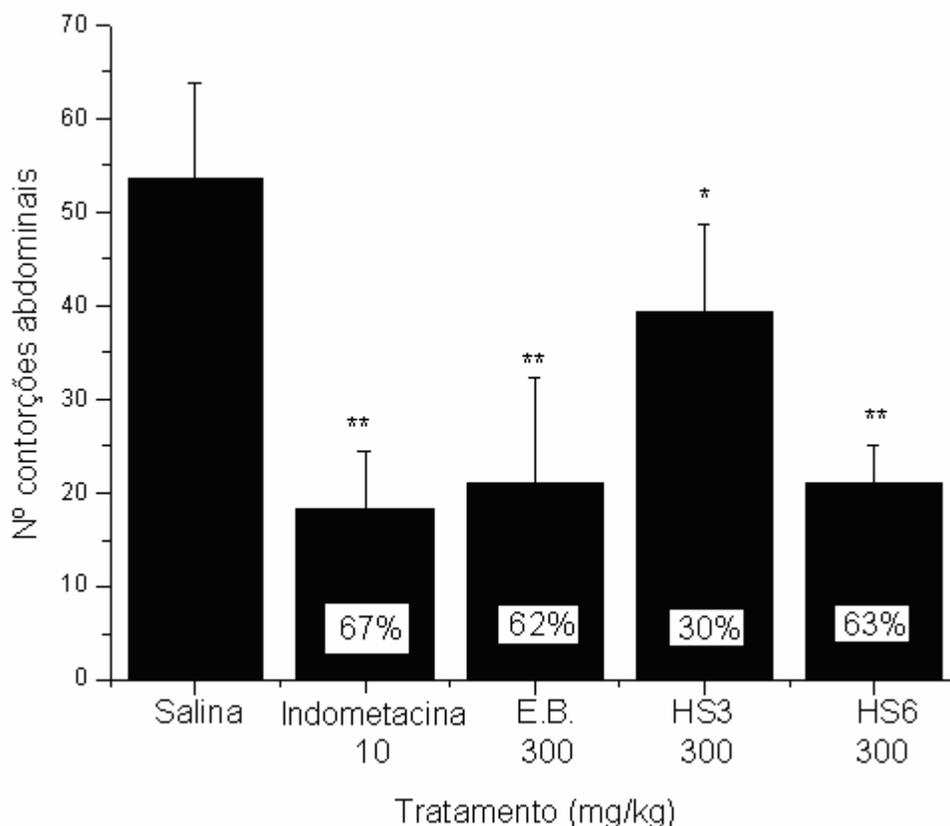
**Figura 16:** Cromatografia de camada delgada (CCD) das frações resultantes da purificação do EB da *P. pubescens* Benth. para obtenção da fração HS6 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: metanol (99:1)] e revelado com reagente de anisaldeído seguido de aquecimento.

## 5.6 ENSAIOS COM A FRAÇÃO HS6 RESULTANTE DO FRACIONAMENTO II

### 5.6.1 Contorções Abdominais Induzidas Por Ácido Acético

**5.6.1.1 Comparação frações HS3, HS6 e EB**

No grupo controle, previamente tratado com solução salina (10 mL/kg, v.o.), a injeção de ácido acético (0,8% em salina 0,9%, i.p.) induziu  $53,6 \pm 10$  contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com o EB, fração HS3 e fração HS6 demonstraram reduzir o número de contorções abdominais em 62% ( $21 \pm 11$ ), 30% ( $40 \pm 9$ ) e 63% ( $21 \pm 4$ ), respectivamente. A indometacina (10 mg/kg), controle positivo deste experimento, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 67% ( $18 \pm 6$ ). Os resultados estão representados no gráfico 10.

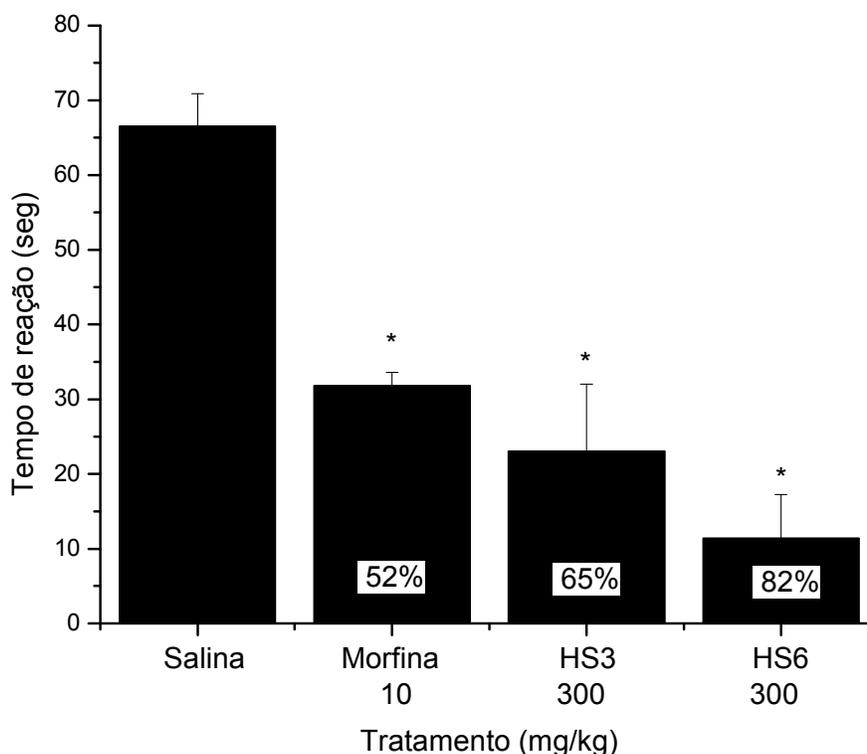


**Gráfico 10:** Contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), indometacina (10 mg/kg), EB, fração HS3, fração HS6 (300 mg/kg). Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de até 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(4,30)} = 12,62$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$ ).

## 5.6.2 Teste Da Capsaicina

### 5.6.2.1 Comparativo das frações HS3 e HS6

A injeção intraplantar de capsaicina (32 µg/mL em salina) na pata posterior de camundongos induz um processo nociceptivo de curta duração (5 minutos). Nos animais previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), a reatividade foi de  $67 \pm 4,37$  segundos. A morfina (10 mg/kg), controle positivo do teste, reduziu a resposta álgica dos animais em 52% ( $31,8 \pm 1,8$  seg.). O pré-tratamento com a fração HS3 (300 mg/kg) reduziu a nocicepção em 65% ( $23 \pm 9$  seg.); a fração HS6 (300 mg/kg) reduziu a nocicepção em 82% ( $11,3 \pm 5$  seg.). Os resultados são demonstrados no gráfico 11.

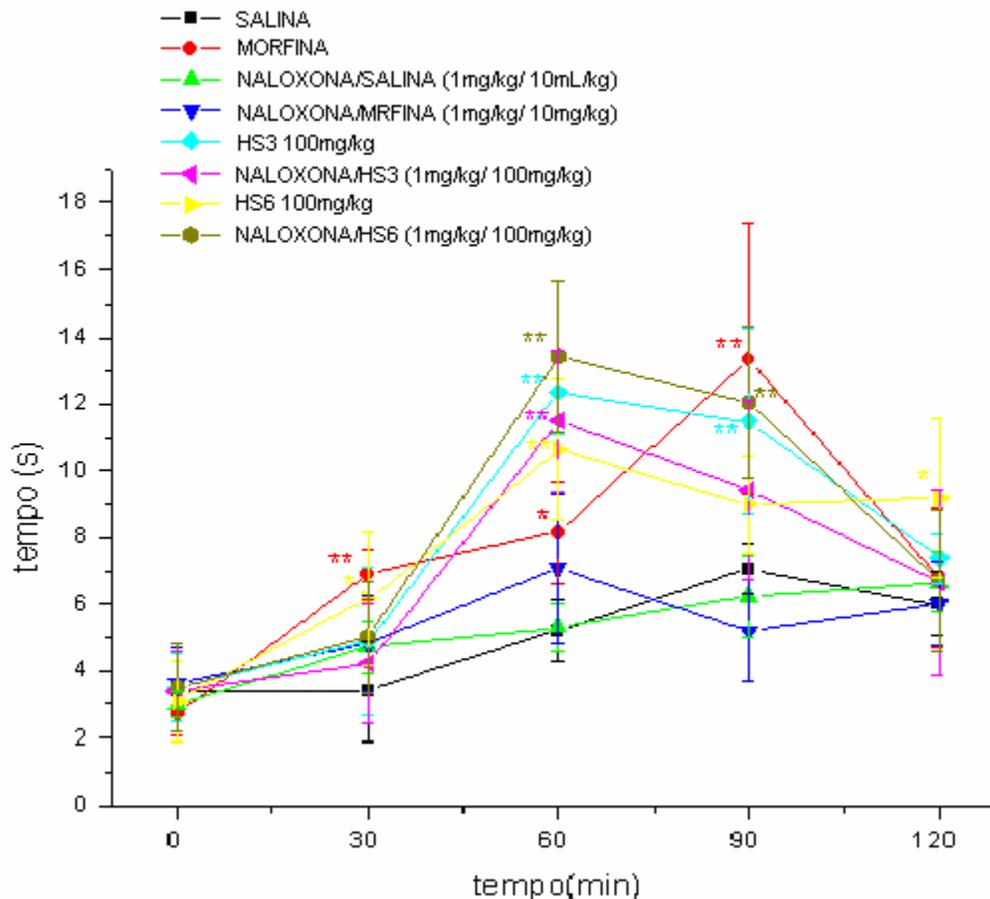


**Gráfico 11:** Reatividade à aplicação intraplantar de capsaicina (1,6 µg/pata) na pata posterior de camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina (10 mg/kg), fração HS3 (300 mg/kg) e fração HS6 (300 mg/kg). As colunas indicam as médias  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA:  $F_{(3,28)} = 130,06$   $p < 0,001$ . Teste de Duncan:  $*p < 0,001$ ).

### 5.6.3 Teste Da Placa Quente

#### 5.6.3.1 Efeito das frações HS3 e HS6, com antagonista opióide Naloxona

Atividade antinociceptiva avaliada utilizando-se morfina como controle positivo do teste e naloxona como controle da atividade opióide. A fração HS3 na dose de 100 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo álgico térmico ( $56,5 \pm 0,1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ) em 237,5% (60 min) e 163,4% (90 min). A fração HS6 na dose de 100 mg/kg aumentou o tempo de reação em 179% (30 min) e 205% (60min). Resultados demonstrados no gráfico 12.



**Gráfico 12:** Reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (60 min) pela via oral com salina (10 mL/kg), morfina (10 mg/kg), naloxona (1 mg/kg) e salina, naloxona e morfina, fração HS3 (100 mg/kg),

## *Resultados*

naloxona/ fração HS3, fração HS6 (100 mg/kg) e naloxona/ fração HS6. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 8 animais por grupo experimental (ANOVA; Basal:  $F_{(7,56)} = 0,61$   $p > 0,05$ ; 30 min:  $F_{(7,56)} = 3,25$   $p < 0,01$ ; 60 min:  $F_{(7,56)} = 24,2$   $p < 0,001$ ; 90 min:  $F_{(7,56)} = 11,85$   $p < 0,001$ ; 120 min:  $F_{(7,53)} = 2,44$   $p < 0,05$ . Teste de DUNCAN: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## *6. Discussão*

A busca por novas substâncias farmacologicamente ativas é uma constante no mundo científico. A indústria farmacêutica investe cada vez mais em pesquisas de novos medicamentos, sejam eles antimicrobianos, antiinflamatórios, ansiolíticos ou analgésicos. Os produtos naturais estão cada vez mais inseridos neste contexto, visto que, servem de fonte para novas moléculas e compostos com potencial farmacológico (Peixoto e Amorim, 2003).

A atividade antiinflamatória do extrato hexânico da *Pterodon pubescens* Benth., foi estudada por Carvalho e colaboradores sugerindo que a atividade antiinflamatória estaria relacionada a inibição da liberação de prostaglandinas e outros mediadores envolvidos no sistema cininas. Sugere ainda que a atividade antiinflamatória do extrato poderia estar relacionada a presença de compostos terpênicos (Carvalho, 1999).

Um estudo do extrato hidroalcoólico das sementes da *Pterodon pubescens* Benth. confirmou seu efeito antiinflamatório em modelo de artrite experimental e a ausência de toxicidade subaguda (Coelho et al., 2001). No CPQBA- UNICAMP, Denny e colaboradores (2002), identificaram o diterpeno furânico 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano como um dos responsáveis pela atividade antiinflamatória do óleo obtido por prensagem das sementes da *P. pubescens*.

Já Silva e colaboradores (2004), relacionaram o sesquiterpeno 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ - dihydroxyvouacapan, com a atividade antiedematogênica do óleo extraído das sementes da *P. pubescens* Benth., e Coelho e colaboradores (2005) com a nocicepção.

Tendo em vista que o trabalho preliminar feito por Denny (2002), demonstrou a ação antiinflamatória do óleo obtido por prensagem das sementes

de sucupira, nos propusemos então, a estudar a possível ação analgésica do extrato diclorometânico (EB), fracioná-lo a fim de identificar os compostos responsáveis por sua ação antinociceptiva e avaliar o provável mecanismo de ação.

Para tanto, foram feitos quatro modelos de nocicepção “*in vivo*”, utilizando camundongos adultos Swiss machos, pesando entre 25 e 35g. São modelos clássicos que avaliam diferentes mecanismos de analgesia, seja ela de origem central, periférica ou inflamatória. Foram utilizados os seguintes modelos de nocicepção: *Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético (Writhing test)* (dor periférica, central e inflamatória), *Algesia Induzida por Formalina* (dor neurogênica e inflamatória) e *Capsaicina* (dor neurogênica) e *Algesia por Estímulo Térmico (Placa Quente)* (dor neurogênica ação central direta).

Primeiramente, verificou-se a possível ação antinociceptiva do EB diclorometânico da *P. pubescens* Benth. Para isso, as sementes passaram por um processo de moagem juntamente com gelo seco, seguido de três extrações com diclorometano.

No trabalho preliminar, demonstrou-se a atividade do óleo obtido por prensagem das sementes. Avaliando-se a atividade do EB diclorometânico em modelo de nocicepção, observou-se a mesma atividade farmacológica. O extrato etanolico resultante da extração do resíduo gerado pelo EB não demonstrou atividade significativa no modelo testado.

O EB foi então testado em quatro ensaios farmacológicos: ensaio hipocrático, modelo de nocicepção induzida por ácido acético, teste da placa quente e teste da formalina.

No ensaio hipocrático, foram feitos seis grupos experimentais, havendo dois grupos controle (solução salina e morfina), e quatro grupos

recebendo doses diferentes do EB (30, 100, 300 e 1000 mg/kg), pela via intraperitoneal. Este modelo permite observar possíveis mudanças comportamentais dos animais tais como estado de consciência e disposição (aparência geral, resposta a frênico vocal), sistema motor (resposta a aperto da cauda), atividade autônoma (piloereção), tono muscular (força para agarrar) e atividade do sistema nervoso central (fenômeno de “Straub”). Durante a avaliação dos animais por um período de três horas, não se observaram mudanças significativas nas características gerais dos grupos tratados com as diversas doses do EB, contrastando com o grupo tratado com morfina que apresentou mudanças significativas nestes parâmetros, próprias do uso de opióides, como por exemplo, diminuídas respostas à aperto da cauda (sistema motor) e força pra agarrar (tono muscular), promoção de “straub” (atividade em SNC) e piloereção (atividade autônoma).

Para dar início ao estudo das propriedades antinociceptivas do óleo extraído das sementes da *P. pubescens* (EB), utilizou-se o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este teste baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (Writhing) como respostas reflexas à irritação produzida pela injeção intraperitoneal de ácidos fracos ou outros agentes inflamatórios (Siegmond et al., 1957). A contagem do número de contorções, durante um tempo pré-determinado, é tomada como índice da resposta nociceptiva (Koster et al., 1959).

O estímulo escolhido para este experimento foi o ácido acético diluído em solução salina a 0,8%, que deve ser utilizado por um período máximo de duas horas. O volume de ácido acético injetado foi constante (10 mL/Kg).

Neste modelo, pode-se avaliar se o extrato possui ou não ação analgésica, seja por dor neurogênica (periférica), central ou inflamatória. O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos,

neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, tais como cininas, acetilcolina, substância P e prostaglandinas. Desta forma, este modelo será sensível a substâncias analgésicas de ação central ou periférica dotada dos mais variados mecanismos de ação (Shafiee, 2003; Cervero, et al., 1999). A reação dolorosa deste teste é sensível a drogas com atividade analgésica semelhante à aspirina, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos opióides de ação central e periférica (Siegmund et al., 1957; Ochi et al., 2000).

Devido a baixa especificidade da resposta antinociceptiva neste teste, ensaios complementares são necessários para a interpretação dos resultados, pois vários compostos como anti-histamínicos, parassimpatomiméticos parasimpatolíticos, estimulantes do sistema nervoso central, inibidores da MAO, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos, podem também inibir as contorções (Rates e Barros, 1994).

Primeiramente foi feita uma curva dose-resposta da concentração do ácido acético a ser utilizado para o experimento. Alguns autores citam soluções de ácido acético 0,6% (Santos et al.; 2005), 0,7% (Shafiee; 2003) ou 0,8% (Goncales; 2005), por isso padronizou-se a concentração que melhor respondesse ao teste em nossos laboratórios. Entre as quatro concentrações testadas, a de 0,8% foi a que melhor promoveu a resposta nociceptiva dos animais (não consta nos resultados).

Padronizada esta concentração, fez-se uma curva dose-resposta do EB da *P. pubescens* Benth., nas doses de 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg. Esta curva dose-resposta foi realizada, com intuito de determinar se o EB possui ação antinociceptiva de forma dose-dependente, visto que a literatura não relata estudos com extrato diclorometânico. Alguns trabalhos utilizam a dose de 300 mg/kg para extrato hexânico e hidroalcoólico (Coelho, 2005; Carvalho, 1999).

Observa-se no *gráfico 1*, que as doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg, não diminuíram o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, ou seja, não houve ação antinociceptiva significativa. Porém, as doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg do EB diminuíram sensivelmente o número de contorções (comparado ao grupo controle negativo), demonstrando ação antinociceptiva dose-dependente, sendo a dose de 300 mg/kg a mais efetiva.

Demonstrada a ação antinociceptiva do EB no modelo de contorções abdominais, investigou-se a possível atividade antinociceptiva por ação central, através do modelo de nocicepção induzida por estímulo térmico (Teste da Placa Quente). Este modelo mede o tempo de reação do animal a um estímulo térmico (Woolfe et al., 1944) sendo semelhante ao teste do tail flick descrito por D'amour e Smith (1941).

A colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50°C determinará uma resposta característica, quando o animal troca rapidamente o apoio dos pés, levanta ou lambe uma das patas. A latência para o aparecimento dessa resposta, cronometrado em segundos, pode ser considerado como indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico (Woolfe e MacDonald, 1944).

Neste teste, os animais são colocados individualmente numa placa quente de temperatura constante (56°C) e devem ser previamente submetidos a este estímulo para que se possa selecionar os mais responsivos ao teste, que deve ser realizado 24 h após esta avaliação.

No teste propriamente dito, após a obtenção de dois valores basais (com intervalos de 30 min) os camundongos são tratados, por via oral, com o veículo (grupo controle), com as diferentes doses do extrato da planta ou morfina (10 mg/kg; controle positivo). A resposta é novamente avaliada decorridos 30, 60, 90 e 120 minutos da administração das drogas. O tempo máximo de contato do

animal com a placa quente deve ser mantido em 20 s (tempo de corte), para evitar lesões nas patas. Este teste fornece resultados consistentes, de forma que grupos experimentais de 8 animais são suficientes para uma boa análise estatística, sendo sensível a drogas opióides como a morfina, cuja atividade analgésica é mediada por receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$ , distribuídos tanto periféricamente, como no sistema nervoso central (Elmer et al., 1998; Tornos et al., 1999). O estímulo térmico produz a nocicepção, determinando que a resposta à placa quente decorre de uma resposta operante de ação central.

A avaliação da possível ação antinociceptiva central do EB da *P. pubescens* Benth., foi feita através de uma curva dose-resposta utilizando as doses de 30 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg e 1000 mg/kg. Observa-se que o EB nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg foi capaz de aumentar o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico após 30, 60 e 90 minutos (*gráfico 2*), demonstrando que o EB possui atividade em dor de origem neurogênica causada por ação direta em SNC.

Para confirmar a ação antinociceptiva do EB por mecanismos centrais, uma segunda curva dose-resposta foi realizada, agora apenas com as doses de 30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg (*gráfico 3*), haja visto que o EB não demonstrou ação analgésica estatisticamente significativa na dose de 1000 mg/kg, possivelmente pela ação autônoma, causando diarreia intensa. Neste ensaio, observou-se que as doses de 100 mg/kg e de 300 mg/kg demonstraram ação antinociceptiva, com ênfase na dose de 100 mg/kg aos 30, 60 e 90 minutos decorrentes do teste.

Demonstrada a ação central e para melhor caracterizar a atividade antinociceptiva do EB da *P. pubescens* Benth., utilizou-se o teste da formalina em camundongos, modelo químico de nocicepção, que fornece uma resposta mais específica comparativamente ao modelo do ácido acético (Tjolsen et al.; 1992).

Descrito originalmente em gatos e ratos, o teste da formalina foi posteriormente adaptado para camundongos (Hunskaar et al.; 1986). A injeção subcutânea de formalina determina o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (Dubuisson e Dennis, 1977).

A formalina, na concentração de 2% (formaldeído 1,2% em solução tampão PBS), é injetada por via subplantar (s.pl.) em uma das patas posteriores, num volume constante de 20 µL/pata (camundongos). Para a injeção s.pl., a agulha, com o bisel voltado para cima, é inserida cuidadosamente através de um dos coxins plantares, sua visualização através da pele permite que a formalina seja sempre injetada na mesma região da pata. A estimulação de fibras nervosas nociceptivas aferentes produz dor intensa, revelada por lambidas, repetidas mordidas e “sacolejos” vigorosos da pata injetada (Tjolsen et al.; 1992).

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

-na **primeira fase** que se inicia após a injeção da formalina e estende-se durante os primeiros 5 minutos, ocorre a produção da dor neurogênica, possivelmente através da estimulação direta de terminações aferentes nociceptivas. A participação de mediadores periféricos como a substância P, bradicinina, histamina e serotonina é bem comprovada. Na medula, a mediação ocorre principalmente através da liberação de substância P e glutamato. Esta fase é inibida por agonistas opióides, como o fentanil e morfina, e por agonistas ou antagonistas de receptores de bradicinina B1 e B2 (Hunskaar et al.;1986, Hunskaar et al.; 1987).

-a **segunda fase** coincide como aparecimento da dor de origem inflamatória. Ela ocorre entre 25 e 45 minutos após a injeção da formalina e está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios

como a histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina. Esta fase é sensível aos antiinflamatórios não esteroidais e esteroidais e aos analgésicos opióides de ação central ou periférica (Hunskaar, et al.; 1987).

As duas fases da resposta a formalina têm mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade a drogas analgésicas. Assim é que à primeira fase é atribuído um caráter neurogênico, sendo sensível a analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é mais bem caracterizada como dor de origem inflamatória, sendo sensível a analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais (Hunskaar & Hole, 1987; Shibata et al., 1989; Abbott et al., 1995).

A estimulação nociceptiva prolongada pode produzir a facilitação da transmissão dolorosa, podendo esta permanecer ativa além do período de estimulação. Tal fenômeno é decorrente do aumento da sensibilidade das terminações nociceptivas periféricas (sensibilização periférica) e pelo aumento da excitabilidade dos neurônios dorsais medulares no SNC (sensibilização central) (Rang e Dale, 1999).

Isto ocorre, após a injeção de formalina, quando tal agente é capaz de induzir um processo nociceptivo persistente (dor de origem inflamatória) subsequente a uma resposta nociceptiva aguda (dor de origem neurogênica). Como mecanismo geral, a estimulação nociceptiva promoveria a liberação de substância P e aminoácidos excitatórios, como o glutamato, de neurônios aferentes da medula dorsal. A associação da despolarização produzida pela substância P com os potenciais excitatórios sinápticos rápidos produzidos pelo glutamato, agindo nos receptores AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol), ocorre desinibição dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) bloqueados por magnésio. A ativação dos receptores NMDA promoverá o influxo de cálcio, ativação da síntese de prostanoídes e óxido nítrico nas células do corno dorsal

que, uma vez difundindo-se para fora destas células, aumentariam a excitabilidade dos neurônios medulares (Rang e Dale, 1999; Carr e Goudas, 1999).

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

Não tendo padronizada a dose para o teste, utilizou-se a dose de 1g/kg para que se avaliasse a ação do EB da *P. pubescens* Benth. O *gráfico 4* representa a **fase I** (0-5 minutos) do teste, que determina a resposta à dor neurogênica (periférica). Observa-se que o E.B reduziu em 42% a reatividade dos animais, com eficácia superior ao grupo controle positivo morfina (27%), demonstrando que a ação antinociceptiva do EB, pode estar relacionada a mecanismos periféricos.

Decorridos 20 minutos da avaliação da dor neurogênica inicia-se a **fase II** do teste, como mostra o *gráfico 5*. Para esta fase, que é sensível a analgésicos antiinflamatórios não-esteroidais, utilizou-se indometacina como controle positivo. A indometacina reduziu em 72%, e o EB reduziu em 92% a reatividade dos animais, evidenciando a ação analgésica do EB na dor de origem inflamatória. A ação antiinflamatória do extrato da *P. pubescens* Benth. foi demonstrada por Denny em 2002.

Estes três ensaios farmacológicos permitiram determinar que o EB possui ação antinociceptiva, e que esta atividade está relacionada tanto à dor de origem neurogênica, central, quanto inflamatória. A próxima etapa do trabalho foi de identificar a (as) fração (ões) mais ativa (s) presente no EB das sementes da *P. pubescens*.

O EB foi pré-purificado (fracionado) através de cromatografia em coluna filtrante. Este método possibilita a separação da amostra por largas faixas de polaridades utilizando-se a proporção de amostra: sílica de 1:3, e comumente emprega-se como fase estacionária Silicagel 60<sup>®</sup> (0,063-0,2mm; Merck). A técnica consiste em recheiar um funil de placa porosa (forma cilíndrica) e acoplar este a um kitassato que com ajuda do sistema de vácuo elui a fase móvel através do mesmo. Esta técnica é rápida e de fácil execução e propicia uma forma de limpeza na amostra permitindo a retirada de graxas e partes muito apolares que normalmente não são de interesse.

Esta primeira purificação do EB forneceu 12 frações, as quais foram agrupadas de acordo com seu perfil cromatográfico, resultando em cinco frações para serem testadas: HS1, HS2, HS3, Hs4 e HS5 (*figuras 10 e 11*).

Por se tratar de um teste menos específico, avaliou-se a ação antinociceptiva das frações no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Neste ensaio (*gráfico 6*), utilizou-se indometacina como controle positivo, que reduziu em 66% o número de contorções abdominais. Das cinco frações avaliadas, duas demonstraram ação antinociceptiva pronunciada: HS3 e HS4 (redução do número de contorções em 71% e 81% respectivamente). Com estes dados, as frações HS3 e HS4 foram selecionadas para serem analisadas em outros modelos de nocicepção, a fim de melhor caracterizar a atividade antinociceptiva das mesmas.

Considerando que o EB demonstrou atividade analgésica central, fez-se o teste da placa quente para que se pudessem comparar os efeitos do EB e das frações HS3 e HS4, a fim de analisar se os compostos responsáveis pela ação analgésica central do EB são os mesmos presentes nestas frações.

Ao comparar os efeitos do EB e das frações HS3 e HS4 no teste da placa quente (*gráfico 7*), observa-se um perfil de resposta antinociceptiva semelhante entre o EB e as frações, principalmente aos 60 e 90 minutos decorrentes do teste, quando houve aumento no tempo de reação dos animais ao estímulo térmico.

Para melhor caracterizar a ação analgésica central das frações HS3 e HS4, foram feitas curvas dose-resposta para ambas, utilizando o mesmo modelo de nocicepção. Através do *gráfico 8*, observa-se que a fração HS3 demonstrou atividade antinociceptiva pelo aumento do tempo de reação dos animais, principalmente na dose de 300 mg/kg aos 60, 90 e 120 minutos decorrentes do teste. A fração HS4 (*gráfico 9*) apresentou perfil de ação semelhante entre as doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg, porém o aumento do tempo de reação foi estatisticamente significativo apenas aos 90 minutos, na dose de 100 mg/kg, dessa forma, a fração HS3 foi selecionada para ser purificada a fim de identificar o composto responsável pela ação antinociceptiva.

Analisando a fração HS3 em cromatografia em camada delgada (CCD), observa-se, através de CG-EM (HP-5890/ HP-5970), a presença do diterpeno furânico 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano (*figura 14*), com íon molecular 360 u.m.a (*figura 20*) com Rf 0,35, o qual foi identificado por Denny (2002), como o responsável pela atividade antiinflamatória do óleo extraído das sementes da *P. pubescens* Benth.

Na fração HS3, também foi identificada a presença de um composto majoritário (*figura 13*), que parece se tratar de ácidos graxos. A próxima etapa do trabalho foi analisar se a ação antinociceptiva estaria relacionada ao composto 6 $\alpha$ -hidroxí, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano, ou ao composto que se apresenta em maior quantidade, denominada fração HS6.

Com intuito de obter quantidades suficientes para análise nos modelos de nocicepção, o EB foi novamente purificado por coluna filtrante e as frações que demonstraram presença da fração HS6, foram purificadas varias vezes utilizando cromatografia em coluna clássica, que é um método mais refinado e mais preciso de separação dos compostos presentes em uma amostra, quando comparado à cromatografia em coluna filtrante.

Após a realização de várias colunas cromatográficas, obteve-se 220 mg da fração HS6, quantidade suficiente para se fazer a análise nos modelos de nocicepção. A ação antinociceptiva da fração HS6 foi avaliada em três modelos experimentais de antinocicepção: contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da capsaicina e teste da placa quente.

O primeiro teste realizado, foi o de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Neste ensaio, foram comparados os efeitos do EB e das frações HS3 e HS6, todos na dose de 300 mg/kg. O *gráfico 10* demonstra que o EB e as frações HS3 e HS6 reduziram o número de contorções abdominais em 62%, 30% e 63% respectivamente. Este teste permitiu identificar que a fração HS6 isolada possui ação antinociceptiva independente do composto com atividade antiinflamatória (6 $\alpha$ - hidroxil, 7 $\beta$ - acetoxivouacapano), identificado por Denny (2002), sugerindo uma possível ação sinérgica entre os ácidos graxos da fração HS6 e o derivado voucapânico, tendo em vista que a atividade do EB e da fração HS6 foram semelhantes.

O teste da formalina, anteriormente citado, demonstrou que o EB possui ação em dor neurogênica, por isso, para melhor caracterizar a atividade antinociceptiva da fração HS6, esta foi submetida ao teste de algesia induzida pela capsaicina (teste da capsaicina). A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-noneamida) é o princípio pungente de uma grande variedade de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* (Lecci et al., 2001).

Para isso, cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de pelo menos 20 minutos. Após este período, os camundongos foram tratados v.o. com salina, fração HS3 e fração HS6 uma hora antes da injeção de capsaicina (20 µl/pata; 2 µg/pata). Registra-se então, durante 5 minutos, o período que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada, medida esta indicativa de dor (Sakurada et al.; 1992, 1993)

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

Observando os resultados do *gráfico 11*, observa-se que ambas as frações HS3 e HS6, reduziram o tempo de reatividade dos animais em 65% e 82% respectivamente, o que demonstra que ambas possuem atividade antinociceptiva para dor neurogênica, relacionada à ativação direta dos nociceptores periféricos, causada pela capsaicina.

Após a demonstração da atividade antinociceptiva do EB e das frações da *P. pubescens* Benth., iniciamos o estudo acerca do mecanismo de ação responsável por esta atividade. Existem diversas vias ou sistemas envolvidos no processo de algesia, podendo ser relacionado a sistema opióide, óxido nítrico, gabaérgico, serotoninérgico dentre outros, onde é possível analisar que tipos de substâncias endógenas ou receptores estão envolvidos no processo de

algesia de um extrato. Com base no resultado do ensaio hipocrático que demonstrou que o EB não apresentou respostas comportamentais semelhantes às observadas com o uso de morfina (opióide), investigou-se a ação analgésica central da fração HS3 e da fração HS6, e a possível correlação com agonistas opióides, utilizando um antagonista de receptores opióides, a naloxona, como controle do experimento.

Neste ensaio (*gráfico 12*) foi feito um grupo controle naloxona/ salina, para demonstrar que a naloxona não tem efeito antinociceptivo. O pré-tratamento com naloxona promoveu reversão do efeito da morfina em todas as fases do experimento. Demonstrou-se, que a fração HS3 e a fração HS6 possuem efeito antinociceptivo de ação central, visto que ambas aumentaram o tempo de reatividade ao estímulo térmico.

A naloxona é um antagonista competitivo inespecífico dos receptores opióides e é utilizada no experimento a fim de bloquear os receptores opióides e verificar se o extrato perde seu efeito antinociceptivo, o que demonstra participação por este sistema. O pré-tratamento com naloxona, não reverteu os efeitos antinociceptivos da fração HS3 e nem da fração HS6, sugerindo que estas, não possuem ação semelhante à morfina (opióides).

Todos estes resultados nos permitem afirmar que a fração HS6, presente no EB das sementes da *Pterodon pubescens* Benth., é um dos responsáveis pela atividade antinociceptiva do mesmo, e que esta fração não possui ação semelhante aos analgésicos opióides (análogo da morfina), confirmando o resultado demonstrado pelo ensaio hipocrático (*tabela 1*).

Este trabalho avaliou alguns dos possíveis mecanismos fisiológicos envolvidos na antinocicepção causada pelo EB das sementes da *Pterodon pubescens* Benth, bem como suas frações ativas. A continuidade do estudo acerca desta planta se faz necessária, uma vez que demonstramos que sua

## *Discussão*

atividade antinociceptiva é decorrente de vários fatores, atuando em sistema nervoso central, em dor neurogênica e dor de origem inflamatória, sugerindo o envolvimento de vários compostos presentes. A próxima etapa do trabalho será na busca dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva do EB e da fração ativa HS6.

## *7. Conclusão*

O presente trabalho pôde demonstrar:

- A ação antinociceptiva do EB extraído das sementes da *Pterodon pubescens* Benth;
- A ação antinociceptiva das frações obtidas do EB extraído das sementes da *Pterodon pubescens* Benth;
- Identificação da fração ativa HS6 envolvida na atividade antinociceptiva.
- Constatação que ambos fração HS6 e o composto 6 $\alpha$ - hidroxí, 7 $\beta$ -acetoxivouacapano estão envolvidos na ação antinociceptiva por mecanismos independentes.
- Demonstração de que a fração HS6 possui atividade antinociceptiva não relacionada às vias opioidérgicas.

## *8. Referências Bibliográficas*

## *Referências Bibliográficas*

Abbott, F.V.; Franklin, K.B.J.; Westbrook, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**. 60: 91-102 (1997).

Appleton, I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and pain. In: Dickenson, A.H.; Besson, J.M. **The pharmacology of pain**. Berlin: Springer-verlag. P. 44-60 (1997).

Bardin, L.; Lavarenne, J.; Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**. 86 (1-2): 11-18 (2000).

Bardin, L.; Tarayre, J.; Koek, W.; Colpaert, F.C. In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT<sub>1A</sub> receptor mediated, behaviorally specific analgesia. **Eur. J. Pharmacol.** 421 (2): 109-114 (2001).

Bartolini, A.; Galli, A.; Ghelardini, C.; Giotti, A.; Malcangio, M.; Malberg-Aiello, P.; Zucchi, P.L. Antinociception induced by systemic administration of local anaesthetics depends on a central cholinergic mechanism. **Br. J. Pharmacol.** 92 (4): 711-21 (1987).

Bartolini, A.; Galli, A.; Ghelardini, C.; Giotti, A.; Malcangio, M.; Malberg-Aiello, P.; Zucchi, P.L. Role of muscarinic receptor subtypes in central antinociception. **Br. J. Pharmacol.** 105 (2): 77-82 (1992).

Besson, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**. 353 (9164): 1610-5 (1999).

Calixto, J. B. Biodiversidade como fonte de novos medicamentos. **Ciência e Cultura**. 55(3): 37-39 (2003).

Calvino, B.; Grilo, R.M. Central pain control. **Join Bone Spine**. In press (2005).

Carr, D.B.; Goudas, L.C. Acute pain. **Lancet**. 353 (9169): 2051-8 (1999).

## *Referências Bibliográficas*

Carvalho Jct, Sertié Jaa, Barbosa Mvj, Patrício Kcm, Caputo Lrg, Sarti Sj, Ferreira Lp, Bastos Jk. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, 64: 127-133, 1999

Casey, K.L. Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 96 914): 7668-74 (1999).

Castro, M.A.S. Mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo do 3-O- Glicosil-diidrocanferol, flavonóide extraído dos rizomas de *Cochlospermum regium* (algodãozinho). Tese (doutorado)- Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. São Paulo, S.P. 155f (2000).

Cervero, F. What is a nociceptor specific (class 3) cell? **Pain**. 62: 123-125 (1995).

Cervero,F.; Laird,J.M. Visceralpain. **Lancet**. 19: 353 (9170): 2145-8 (1999).

Charles, K.J.; Evans, M.L.; Robbins, M.J.; Calver, A.R.; Leslie, R.A.; Pangalos, M.N. Comparative immunohistochemical localization of GABA (B1a), GABA (B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion. **Neuroscience**. 106 (3): 447-67 (2001).

Coelho, M. G. P.; Marques, P. R.; Gayer, C. R. M.; Vaz, L.C.A.; Neto, J. F. N.; Sabino, K. C.C. Subacute toxicity evaluation of a hydroalcoholic extract of *Pterodon pubescens* seeds in mice with collagen-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology** 77:159-164, 2001.

Coelho, L.P.; Reis, P.A.; Castro, F.L.; Gayer, C.R.M.; Lopes, C.S.; Silva, M.C.C.; Sabino, K.C.C.; Todeschini A.R.; Coelho, M.G.P. Antinociceptive properties of

## *Referências Bibliográficas*

ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**.98: 109-116 (2005).

Coggeshall, R.E.; Carlton, S.M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain res. Rev.** 24 (1): 28-66 (1997).

Colpaert, F.C.; Tarayre, J.P.; Koek, W.; Pauwels, P.J.; Bardin, J.; Xu, X.J.; Wiesenfeld-Hallin, Z.; Cosi, C.; Carilla-Durand, E.; Assié, M.B.; Vacher, B. Large amplitude 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. **Neuropharmacology**. 43 (6): 945-958 (2002).

Cordel, G.A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry**. 55: 463-480 (2000).

Correa, C.R.; Kyle, D.J.; Chakraverty, S.; Calixto, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **Br. J. Pharmacol.** 117 (3): 552-558 (1996).

Cragg, G. M., Newman, D. J. Discovery and Development of Antineoplastic Agentes from Natural Sources. **Cancer Investigation**, **17(2)**, 153-163, 1999.

Cragg, M.G.; Newman, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. 100: 72-79 (2005).

D'Amour, F.E.; Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 72: 74-79 (1941).

Denny, C., Atividade Antiinflamatória do óleo de *Sucupira Pterodon pubescens* Benth., **Dissertação Mestrado**, Faculdade de Odontologia de Piracicaba-Unicamp, 2002

## *Referências Bibliográficas*

Deseure, K.; Koek, W.; Colpaert, F.C.; Adriaensen, H. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist F 13640 attenuates mechanical allodynia in a rat model of trigeminal neurophatic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 456(1-3): 52-57 (2002).

Dos Santos Filho J.I.; Armond G. Sodium chloride electrolysis in aqueous solution in radicular canals healing. **Arq. Cent. Estud. Fac. Odontol. UFMG.** 11(2):231-43 (1972).

Dray, A. Peripheral mediators of pain. In Dickenson , A.H.; Beson, J.M. **The pharmacology of pain.** Berlin: Springer-Verlag; p. 21-41 (1997).

Duarte, I. D. G.; Alves, D. L. F. ; Veloso, D. P.; Nakamura-Crag, M. Evidence of the involvement of biogenic amines in the antinociceptive effects of vouacapan extracted from *Pterodon polygalaeflorus* Benth **Journal of Ethnopharmacology** 55:13-18, 1996.

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

Elisabetsky, E., Ahmador, T.A., Albuquerque, R.R., Nunes, D.S. And Carvalho, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild. ex-R. and S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology** 48 (1995).

Elmer, G.I.; Pieper, J.O.; Negus, S.S.; Woods, J.H. Genetic variance in nociception and its relationship to the potency of morphine-induced analgesia in thermal and chemical tests. **Pain.** 75: 129-140 (1998).

Fascio M, Mors Wb, Gilbert B, Mahajan Jr, Monteiro Mb, Dos Santos Filho D, Vichnewski W. Diterpenoid Furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**; 15: 201-203, 1975

## *Referências Bibliográficas*

Fellows, L. E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects IN: Coombs, J.D.,ed. New drugs from natural sources. London: IBC Technical Services, 1995.

Ferreira, J.; Trichês, K.M.; Medeiros, R.; Calixto, J.B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation. **Pain**. 117: 171-181 (2005).

Ferreira, S.H. Hiperalgisia inflamatória, óxido nítrico y control periférico del dolor. **Ver. Lat. Amer. Del Dolor**. 1 (2): 6-17 (1995).

Ferreira, S.H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**. 46 (1): 1-9 (1993).

Ferri, M.G. *Plantas do Brasil. Espécies do cerrado*. Editora Edgard Blücher. São Paulo, 1969, p.12-13 and p 50-1.

Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull**. 48 (2): 129-41 (1999).

Gebhart, G. F. Descending modulation of pain. **Neurosci. Biobehav. Rev**. 27 (8): 729- 37 (2004).

Goncales, C.E.P.; Araldi, D.; Panatieri, R.B.; Rocha, J.B.T.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Antinociceptive properties of acetylenic thiophene and furan derivatives: Evidence for the mechanism of action. **Life Sci**. 76: 2221- 2234 (2005).

## *Referências Bibliográficas*

Gualtieri, F.; Romanelli, M.N.; Teodori, E. On the site of interaction of some muscarinic agonists and competitive antagonists. **Farmac.** 44(10): 897-909 (1989).

NIH publications nº 82-23. Guide For The Care And Use Laboratory Animals (1996) revised.

Hui, L.I.; Le, W.U.; Yun-Qing, L.I. Opioid peptides modulate the response of neurons of the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn to GABA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 307 (3): 730-736 (2003).

Hunskar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. Formalin tes in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods.** 14: 69-73 (1985).

Hunskar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30: 103-14 (1987).

Hunskar, S; Berger, O.G; Hole, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain 25:** 125-132, 1986.

International Guiding Principles For Biomedical Research Involving Animals- CIOMS. Genebra (1985).

Jensen , T.S.; Yaksh, T.L. Effects of an intrathecal dopamine agonist, apomorphine, on thermal and chemical evoked noxious responses in rats. **Brain Res.** 296 (2): 285-93 (1984).

Julius, D.; Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413 (6852): 203-10 (2001).

## *Referências Bibliográficas*

Koster, R.; Anderson, M.; Beer, E.J. Acetic Acid for analgesic screening. **Fed. Proceeding.** 18: 412 (1959).

Laird, J.M.A.; Roza, C.; Felipe, C.; Hunt, S.P.; Cervero, F. Role of central peripheral tachykinin NK1 receptors in capsaicin-induced pain hiperalgesia in mice. **Pain.** 90- 97-103 (2001).

Lecci, A. Antinociceptive and pro-inflammatory roles for NPY Y1 receptors. **Trends in Pharmacological Sciences.** 22 (5): 221 (2001).

Lee, J.J.; Hahm, E.T.; Min, B.I.; Han, S.H.; Cho, J.J.; Cho, Y.W. Roles of protein kinase A and C in the opioid potentiation of the GABA<sub>A</sub> response in rat periaqueductal gray neuron. **Neuropharmacol.** 44 (5): 573-583 (2003).

Lewis, D. A. & Hanson, P. J. Anti-ulcer of plant origin. **Progress in Medicinal Chemistry, 28:** 201-231, 1991.

Loeser, J.D.; Melzack, R. Pain: an overview. **Lancet.** 353(9164): 1607-9 (1999).

Lorenzi H. Árvores Brasileiras. Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil, vol.1-2th ed. São Paulo, 227, 1998

Mahjan Jr, Monteiro Mb. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Journal of the Chemical Society Perkintrans;** 1:520-525,1973.

Meller, S.T.; Gebhart, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain.** 52 (2): 127-36 (1993).

Michael – Titus, A.; Boussemame, R.; Costentin, J. Stimulation of D<sub>2</sub> receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkefalinergic link. **Eur. J. Pharmacol.** 187: 201- 207 (1990).

## *Referências Bibliográficas*

Millan, M.J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66(6): 355-474 (2002).

Millan, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57 (1): 1-164 (1999).

Millan, M.J.; Girardon, S.; Bervoets, K. 8-OH-DPAT-induced spontaneous tail flicks in the rat are facilitated by the selective serotonin (5-HT) 2C agonist, RO 60-0175: blockade of its actions by the novel 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB 206,553. **Neuropharmacol.** 36 (4-5): 743-5 (1997).

Missale, C.; Nash, S.R.; Robinson, S.W.; Jaber, M.; Caron, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.** 78 (1): 189-225 (1998).

Morgan, Mj.; Franklin, K.B. Dopamine receptor subtypes and formalin test analgesia. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 40(2): 317-22 (1991).

Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S. & Takayuki, S. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors as compared to those of teprenone and cimetidine. **Japan. J. Pharmacol.** 57:495-505,1991.

Morita, T.; Assumpção, R.M.V. Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. **Ed. Edgard Blücher Ltda.** 2 ed., SP- Brasil (1986).

Mors, W. B., Pellegrino, J., Santos Filho, M. F. Ação profilática do óleo dos frutos de sucupira-branca (*Pterodon pubescens* Benth.) contra a infecção pelo *Schistosoma mansoni*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 38: 325-330, 1966.

## *Referências Bibliográficas*

Nodari, R.O.; Guerra, M. P.; Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia\_ Da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC (1999).

Obata, H.; Saito, S.; Sasaki, M. Goto, F. Interactions of 5-HT<sub>2</sub> receptor agonists with acetylcholine in spinal analgesic mechanisms in rats with neuropathic pain. **Brain Res.** 965(1-2):114-120 (2003).

Ochi, T.; Ohkubo, Y.; Mutoh, S. The spinal antinociceptive effect of kyotorphin in mice: involvement of the descending noradrenergic and serotonergic systems. **Neurosci. Lett.** 329 (2): 193-6 (2002).

Ochi, T.; Motoyama, Y.; Goto, T. The analgesic effect profile of FR122047, a selective cyclooxygenase-1 inhibitor, in chemical nociceptive models. **Euro. J. Pharmacol.** **391**: 49-54, 2000.

Ossipov, M.H.; Chatterjee, T.K.; Gebhar, G.F. Locus coeruleus lesions in the rat enhance the antinociceptive potency of centrally administered clonidine but not morphine. **Brain Res.** 341(2): 320-30 (1985).

Peixoto, A.L.; Amorim, M.P. Coleções botânicas: Documentação da biodiversidade Brasileira. **Ciência e Cultura.** 55(3): 21-24 (2003).

Poon, A.; Sawynok, J. Antinociception by adenosine analogs and inhibitors of adenosine metabolism in an inflammatory thermal hyperalgesia model in the rat. **Pain.** 74 (2-3): 235-45 (1998).

Pozetti, G. L., Bernardi, A. C. Contribuição ao estudo químico de *Brosimum gaudichaudii* Trec. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara**, v.5, n.2, 189-193 (1971).

Prezewocki, R.; Przewocka, B. Opioids in chronic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 429(1-3): 79-91 (2001).

Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; **Farmacologia.** 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1999).

Rates, S.M.K.; Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Ver. Bras. Farm.** 75(2):31-34 (1994).

Santos, A.R.S.; Gadotti, V.M.; Oliveira, G.L.; Tibola, D.; Paszuck, A.P.; Neto, A.; Spindola, H.M.; Souza, M.M.; Rodrigues, A.L.S.; Calixto, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacol.** 48: 1021- 1034 (2005).

Sakurada, T.; Katsumata, K.; Tan-No, K.; Sakurada, S.; Kisara, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacol.** 31: 1279-1285 (1992).

Sawynok, J.; Reid, A. Noradrenergic mediation of spinal antinociception by 5-hydroxytryptamine: characterization of receptor subtypes. **Eur. J. Pharmacol.** 223(1): 49-56 (1992).

Scholz, J.; Woolf, C.J. Can we conquer pain? **Nat. Neurosci.** 5: 1062-7 (2002).

Shafiee, A.; Bagheri, M.; Shekarchi, M.; Abdollahi, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. **J. Pharm. Sci.** 6 (3) : 360 – 2 (2003).

Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.** 38:347-52 (1989).

Siegmund, E.; Cadmus, R.; Lu, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** **95**: 729 (1957).

Silva, M.C.C., Gayer C.R.M., Lopes C.S., Calixto N.O., Reis P.A., Passeas C.P.B., Paes M.C., Dalmau S.R., Sabino K.C.C., Todeschini A.R., Coelho M.G.P., Acute and Topic Anti-edematogenic fractions Isolated From The Seeds of *Pterodon pubescens*, **Pharmacy and Pharmacology**, 55, 135-141 (2004).

Sojearto, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **J. Ethnopharmacol.** 51: 1-15 (1996).

Sounvaravong, S.; Nakashima, M.N.; Wada, M. ; Nakashima, K. Decrease in serotonin concentration in raphe magnus nucleus and attenuation of morphine analgesia in two mice models of neurophatic pain. **Eur. J. Pharmacol.** 26: 484 (2-3):217-23 (2004).

Suh, H.H.; Fujimoto, J.M.; Tseng, L. L. Differential mechanisms mediating beta-endorphin- and morphine- induced analgesia in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 168 (1):61-70 (1989).

Szallasi, A. Autoradiografic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species including in man. **Acta Physiologica scandinavica.** 155: 1-68 (1999).

Tasker, R.A.; Connel, B.J.; Yole, M. J. systemic injections of alpha-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. **Pain.** 49(3): 383-91 (1992).

Tjolsen, A.; Berge, O.G.; Hunskaar, S.; Rosland, J.H.; Hole, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** 51(1): 5-17 (1992).

## *Referências Bibliográficas*

Todd, A.J.; Spike, R.C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol.** 41 (5): 609-45 (1993).

Tornos, M.P.; Sáenz, M.T.; García, M.D.; Fernández, M.A.; Antinociceptive effects of the tubercles of *Anredera leptostachys*. **Journal of Ethnopharmacology.** 68: 229-234 (1999).

Vacher, P.J.; Duchene-Marullaz, P.J.; Barbot, P. A propos de quelques produits usuels comparaison de deux methodes detude des analgésiques. **Med. Exp.**, 11:51-58 (1964).

WAIGH, R. D. The chemistry behind atracurium. **Chem Britain** , 24: 1209-12, 1988.

Wess, J.; Duttaroy, A.; Gomeza, J.; Zhang, W.; Yamada, M.; Felder, C.C.; Bernardini, N.; Reeh, P.W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: a review. **Life Sci.** 72(18-19): 2047-54 (2003).

Wiertelack, E.P.; Furness, L.E.; Horan, R.; Martinez, J.; Maier, S.F.; Watkins, L.R. Subcutaneous formalin produces centrifugal hiperalgesia at a non- injected site via NMDA-nitric oxide cascade. **Brain. J. Immunopharm.** 22: 1131-1135 (2000).

Woolfe, G.; Macdonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 80: 300-307, 1944.

Zarrindast, M.R.; Massiri-Rad, S.; Pazouki, M. Effects of dopaminergic agents on the antinociception in formalin test. **Gen. Pharmacol.** 32(4): 517-22 (1999).

## *Referências Bibliográficas*

Zhang, C.; Yang, S.W.; Guo, Y.G.; Qiao, J.T.; Dafny, N. Locus coeruleus stimulation modulates the nociceptive response in parafascicular neurons: an analysis of descending and ascending pathways. **Brain. Res. Bull.** 42(4):273-8 (1997).

## *9. Anexos*



Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 766-1, sobre "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE FAÇÕES RESULTANTES DO ÓLEO DAS SEMENTES DE PTERODON PUBESCENS BENTH" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Ann Foglio / Humberto Moreira Spindola está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 17 de fevereiro de 2005.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 766-1, entitled "PTERODON PUBESCENS SEED'S CRUDE OIL AND FRACTIONS' ANTICONCEPTIVE ACTIVITY EVALUATION", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 17, 2005.

Campinas, 17 de fevereiro de 2005.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP