

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS ISOLADOS DE PLANTAS DO GÊNERO  
*Phyllanthus* (QUEBRA-PEDRA)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.  
Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto.

ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS

Florianópolis  
1995

SANTOS, Adair Roberto Soares. *Efeito antinociceptivo de extratos e princípios isolados de plantas do gênero *Phyllanthus* (Quebra-Pedra)*. Florianópolis, 1995. 104f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto  
Defesa: 10/03/95

Estudo do efeito [antinociceptivo] dos [extratos hidroalcoólicos] e compostos ativos isolados das espécies de [plantas] do gênero [*Phyllanthus*], em vários modelos de [nocicepção] em [camundongos]. Os compostos isolados das espécies de *Phyllanthus*, bem como seus extratos, causaram efeito analgésico nos testes de dor induzido pela injeção de [ácido acético], [formalina] e [capsaicina]. O [mecanismo] de ação analgésica desses extratos não está completamente esclarecido, mas não parece estar relacionado com a interação com os [opióides endógenos], com a liberação dos [glicocorticóides endógenos], com a interação com o sistema [ $\alpha$ -adrenérgico], [serotonérgico], com a via [L-arginina-óxido nítrico], ou com a inibição da síntese das [prostaglandinas]. Além disso, os resultados mostraram que as ações analgésicas independem da depressão do sistema nervoso central ou periférico. Contudo, os extratos e compostos, apresentaram forte efeito analgésico nos modelos de dor de origem neurogênica induzida pela formalina e pela capsaicina, sugerindo um mecanismo de ação relacionado pelo menos em parte com os neuropeptídeos álgicos, incluindo as taquicininas.


[testes tail-flick, placa quente, rota-rod]

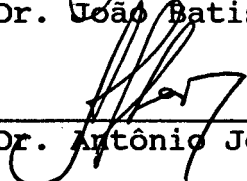
**"EFEITO ANTINOCICEPTIVO DE EXTRATOS E PRINCÍPIOS  
ISOLADOS DE PLANTAS DO GÊNERO PHYLLANTHUS  
(QUEBRA-PEDRA)"**


POR

ADAIR ROBERTO SOARES DOS SANTOS

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. João Batista Calixto

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antônio José Lapa

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rosendo Augusto Yunes

Florianópolis, março de 1995.

*A ciência é a procura da verdade; não é um jogo no qual uma pessoa tenta derrubar seus oponentes, prejudicar outras pessoas.*

*Linus Pauling*

Este trabalho é dedicado à Romalina, que soube compreender, auxiliar e incentivar em todos os momentos; aos meus pais João e Guilhermina que forneceram toda a força e garra necessárias para persistir na luta e concluir mais esta etapa; a eles, com carinho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Batista Calixto, meu especial agradecimento pela oportunidade de trabalharmos juntos, e pela confiança e estímulo constantes que culminaram na realização desta dissertação.

Ao professor Dr. Rosendo Augusto Yunes agradeço pela inestimável colaboração na concretização desse trabalho.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, em especial aos Dr. Giles Alexander Rae e Dr. Yara dos Santos Medeiros pela colaboração.

Aos funcionários do Departamento que, direta ou indiretamente, auxiliaram-me no desenvolvimento desse trabalho, especialmente ao Juarez Polidoro e à Josane Reischl.

À Rosana Ostrosky e Elizabete Ganzer Ramos pela amizade, carinho e colaboração.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química pelo fornecimento dos extratos e princípios ativos, e pela constante colaboração, especialmente aos amigos Marisa M. Ciarallo, Valdir Cechinel Filho, Rivaldo Niero e Obdulio G. Miguel.

Aos professores Leila da Graça Amaral e Antônio Reis e à bióloga Mirian Ulyssea do Departamento de Botânica, pela classificação botânica das espécies de *Phyllanthus*.

Ao professor Dr. Pedro Melillo Magalhães da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA), pela classificação botânica do *P. corcovadensis*.

Aos colegas de turma, Adriana, Jonny, Márcia e Raquel, e aos demais colegas de curso, em especial à Zulma Raquel Vaz, Daniela de Almeida Cabrini, Nivaldo Paulino e Mariem El Sayad pela colaboração, amizade e companheirismo.

Aos colegas de iniciação científica, pela troca de informações e evolução conjunta, especialmente à Maria Martha Campos.

Aos amigos do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Caridade, em especial ao Farmacêutico-Bioquímico Saulo Correa de Mello.

Minha gratidão a todos os meus familiares pelo constante incentivo, especialmente aos meus irmãos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Ao Todo Poderoso, por me permitir vencer mais essa etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS . . . . .	ix
LISTA DE TABELAS . . . . .	xi
RESUMO . . . . .	xii
1 - INTRODUÇÃO . . . . .	1
2 - OBJETIVOS . . . . .	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	10
3.1 - Animais . . . . .	10
3.2 - Classificação botânica das espécies de <i>Phyllanthus</i> . . . . .	10
3.3 - Análise química . . . . .	11
3.3.1 - Preparação do extrato hidroalcoólico (EH) das espécies de <i>Phyllanthus</i> . . . . .	11
3.3.2 - Isolamento dos compostos puros . . . . .	11
3.4 - Análise farmacológica . . . . .	12
3.4.1 - Atividade antinociceptiva . . . . .	12
3.4.1.1 - Teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético . . . . .	12
3.4.1.2 - Dor induzida pela formalina . . . . .	13
3.4.1.3 - Teste do tail-flick . . . . .	14
3.4.1.4 - Teste da placa-quente . . . . .	15
3.4.1.5 - Efeito sobre a performance motora (rota-rod) . . . . .	16
3.4.1.6 - Dor induzida pela capsaicina . . . . .	17
3.5 - Estudo do possível mecanismo de ação analgésica dos extratos das diversas espécies de <i>Phyllanthus</i> . . . . .	18
3.5.1 - Efeito do tratamento com naloxona . . . . .	18
3.5.2 - Efeito do tratamento com prazosin e ioimbina . . . . .	18
3.5.3 - Efeito do tratamento com L-arginina . . . . .	19



3.5.4 - Efeito do tratamento com p-clorofenilalanina e metisergida . . . . .	19
3.5.5 - Efeito dos glicocorticóides endógenos . . . . .	20
3.6 - Drogas e soluções usadas . . . . .	20
3.7 - Análise estatística . . . . .	21
4 - RESULTADOS . . . . .	22
4.1 - Dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético . . . . .	22
4.2 - Dor induzida pela formalina . . . . .	26
4.3 - Dor induzida pela capsaicina . . . . .	34
4.4 - Efeito dos EHs das várias espécies de <i>Phyllanthus</i> nos testes do tail-flick e placa-quente . . . . .	37
4.5 - Efeito dos EHs das várias espécies de <i>Phyllanthus</i> na atividade locomotora (rota-rod) . . . . .	38
4.6 - Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptiva das espécies de <i>Phyllanthus</i> . . . . .	39
4.6.1 - Efeito do pré-tratamento com naloxona . . . . .	39
4.6.2 - Efeito do pré-tratamento com prazosin e ioimbina . . . . .	40
4.6.3 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina . . . . .	41
4.6.4 - Efeito do pré-tratamento com PCPA e metisergida . . . . .	42
4.6.5 - Influência da adrenalectomia . . . . .	44
4.7 - Efeito analgésico dos compostos isolados das várias espécies de <i>Phyllanthus</i> . . . . .	44
4.7.1 - Dor causada pela injeção de ácido acético . . . . .	44
4.7.2 - Dor induzida pela formalina . . . . .	46
4.7.3 - Dor induzida pela capsaicina . . . . .	51
5 - DISCUSSÃO . . . . .	52
SUMMARY . . . . .	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	72

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Efeito analgésico dos EHs das espécies de *P. urinaria* e *P. niruri* sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético . . . 23
- FIGURA 2 - Efeito analgésico dos EHs das espécies de *P. sellowianus* e *P. tenellus* sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético . 24
- FIGURA 3 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. urinaria* na dor induzida pela formalina . . . . . 28
- FIGURA 4 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. niruri* na dor induzida pela formalina . . . . . 29
- FIGURA 5 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. tenellus* na dor induzida pela formalina . . . . . 30
- FIGURA 6 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. sellowianus* na dor induzida pela formalina . . . . . 31
- FIGURA 7 - Efeito analgésico dos EHs das espécies de *P. urinaria* e *P. niruri* em relação à dor induzida pela capsaicina . . . . . 35
- FIGURA 8 - Efeito analgésico causado pela indometacina, morfina e dipirona em relação à dor induzida pela capsaicina . . . . . 36
- FIGURA 9 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . . . 39
- FIGURA 10 - Influência do pré-tratamento de camundongos com antagonistas dos  $\alpha$ -adrenoceptores sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* e pelos agonistas  $\alpha$  adrenérgicos em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . 40
- FIGURA 11 - Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* e pela L-NOARG em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . 41
- FIGURA 12 - Influência do pré-tratamento com p-clorofenilalanina (PCPA) sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . . 42
- FIGURA 13 - Influência do pré-tratamento com metisergida sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . . . . 43
- FIGURA 14 - Efeito analgésico causado pelo composto 3 isolado das espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina . . . . . 47
- FIGURA 15 - Efeito analgésico causado pelo composto 2 isolado das espécies de *Phyllanthus* na dor induzida pela formalina . . . . . 48

FIGURA 16 - Efeito analgésico causado pelo composto 1 isolado das espécies de <i>Phyllanthus</i> na dor induzida pela formalina . . . . .	49
FIGURA 17 - Efeito analgésico causado pelo stigmasterol isolado das espécies de <i>Phyllanthus</i> na dor induzida pela formalina . . . . .	50
FIGURA 18 - Efeito analgésico causado pelos compostos 1, 2 e 3 isolados das espécies de <i>Phyllanthus</i> em relação à dor induzida pela capsaicina . . . . .	51

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito analgésico causado pela aspirina e pelo acetoaminofen sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. . . . .	25
TABELA 2 - Efeito analgésico tempo-dependente dos EHs das várias espécies de <i>Phyllanthus</i> sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético . . . . .	26
TABELA 3 - Efeito analgésico da aspirina na dor induzida pela formalina . . . . .	32
TABELA 4 - Efeito analgésico do acetoaminofen e da indometacina na dor induzida pela formalina . . . . .	33
TABELA 5 - Efeito do tratamento com morfina e com os EHs das espécies de <i>Phyllanthus</i> no teste da placa-quente e tail-flick . . . . .	37
TABELA 6 - Efeito dos EHs das várias espécies de <i>Phyllanthus</i> em relação à performance motora no teste do rota-rod . . . . .	38
TABELA 7 - Efeito da adrenalectomia dos animais sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do <i>P. urinaria</i> e <i>P. niruri</i> em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina . . . . .	44
TABELA 8 - Efeito analgésico causado pelo stigmasterol e B-sitosterol isolados das espécies de <i>Phyllanthus</i> sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético . . . . .	45

## RESUMO

1 - No presente estudo foram analisadas as ações analgésicas dos extratos hidroalcoólicos (EH) e de alguns princípios ativos obtidos das folhas, caules e raízes de plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, incluindo o *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus* em vários modelos de nocicepção em camundongos, com ênfase nos modelos de dor de origem neurogênica.

2 - Os EHs das espécies de *Phyllanthus*, administrados por via i.p. ou por via oral em camundongos, causaram ação antinociceptiva de maneira dose-dependente na dor induzida pela injeção de ácido acético com potência comparável à aspirina e ao acetoaminofen. A ordem de potência observada foi: *P. urinaria* > *P. tenellus* > *P. niruri* > *P. sellowianus*. Efeito analgésico semelhante foi observado em relação à primeira (dor neurogênica) e à segunda fase (dor inflamatória) da dor induzida pela formalina em camundongos, sendo os EHs mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. Ao contrário, a indometacina, a aspirina e o acetoaminofen inibiram apenas a segunda fase da dor causada pela formalina. Além disso, a indometacina, mas não os diversos EHs testados, causou inibição do edema de pata associado à segunda fase desse modelo. Os EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* administrados por via i.p ou oral causaram efeito analgésico de maneira dose-dependente na dor de origem neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. A dipirona e a morfina também apresentaram ação analgésica significativa nesse modelo, enquanto que a indometacina foi inativa. Esses resultados sugerem que as ações antinociceptivas dos princípios ativos presentes nas plantas do gênero *Phyllanthus* podem estar relacionadas, pelo menos em parte, a uma ação modulatória sobre os neuropeptídeos álgicos, especialmente

com as taquicininas, reconhecidamente envolvidas na gênese da dor de origem neurogênica.

3 - Os EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* administrados por via oral em dose maior que a necessária para causar analgesia, não afetaram o edema de pata de rato induzido pela carragenina, sugerindo que suas ações antinociceptivas independem da inibição da síntese de prostaglandinas.

4 - Os EHs das espécies de *Phyllanthus* não causaram analgesia quando testados nos modelos da placa-quente e no tail-flick, enquanto a morfina foi efetiva. Além disso, os EHs não interferiram com a atividade locomotora dos animais no modelo do rota-rod. Esses resultados sugerem que a atividade antinociceptiva dos princípios ativos presentes nos EHs não parece estar relacionada com a depressão do sistema nervoso central ou periférico e é seletiva para alguns modelos de dor, particularmente a de origem neurogênica.

5 - As ações antinociceptivas causadas pelos EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* não foram afetadas pelo pré-tratamento dos animais com a naloxona, pelos antagonistas dos adrenoreceptores  $\alpha_1$  (prazosin) e  $\alpha_2$  (ioimbina), antagonista de receptores (metisergida) ou da síntese de serotonina (PCPA) e pelo precursor do óxido nítrico (L-arginina), quando testados em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Nas mesmas condições, essas drogas reverteram quase que completamente as ações analgésicas causadas por agonistas seletivos desses receptores e/ou enzimas.

6 - A adrenalectomia dos animais, 15 dias antes, não interferiu significativamente com a atividade analgésica das espécies de *Phyllanthus*, quando

analisada em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Tais resultados indicam que as ações analgésicas das espécies de *Phyllanthus* estudadas independem da liberação dos glicocorticóides endógenos.

7 - A análise química dos EHs dessas plantas permitiu isolar vários compostos de distintas natureza química, incluindo alguns esteróides, flavonóides, taninos, alcalóides entre outros. Alguns desses compostos administrados por via i.p. apresentaram o mesmo perfil de ação analgésica detectado para os EHs, especialmente quando testados nos modelos de dor de origem neurogênica. Esses resultados indicam que compostos de distintas naturezas químicas existentes nessas plantas do gênero *Phyllanthus* estudadas parecem atuar de maneira sinérgica, explicando assim a potente ação antinociceptiva evidenciada nos EHs dessas plantas.

8 - Esses resultados, analisados em conjunto, permitem sugerir que as plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus* estudadas apresentam um importante perfil de ação analgésica, tanto administrados pela via i.p. quanto pela oral, em relação a vários modelos de nocicepção em camundongos, especialmente na dor de origem neurogênica. O mecanismo de ação analgésica desses princípios ativos não está ainda completamente esclarecido, mas não parece estar relacionado com a interação com os opióides endógenos, inibição da síntese de prostaglandinas, com a liberação dos glicocorticóides endógenos, com a interação com o sistema  $\alpha$ -adrenérgico, serotoninérgico ou com a via da L-arginina-óxido nítrico. Além disso, os resultados mostram claramente que as ações analgésicas dos EHs das espécies de *Phyllanthus* independem de efeitos tóxicos relacionados à depressão do sistema nervoso central ou periférico. Contudo, o fato de os EHs e compostos isolados dessas plantas apresentarem forte efeito antinociceptivo nos modelos de dor de

origem neurogênica induzida pela capsaicina e pela formalina em camundongos sugere um mecanismo de ação relacionado com os neuropeptídeos, incluindo as taquicininas. Porém, essa hipótese precisa ser melhor investigada. Além disso, a possibilidade desses princípios ativos estarem também interagindo com os aminoácidos excitatórios tipo glutamato ou aspartato não pode ser totalmente descartada. Esses estudos abrem, portanto, novas perspectivas para o uso dessas plantas como analgésicos e podem contribuir para explicar seus efeitos benéficos no tratamento das afecções renais ou biliares, incluindo o cálculo renal e biliar.

Parte desses resultados foram publicados, ou estão aceito para publicação, nas seguintes revistas:

- Journal Pharmacy and Pharmacology, 46: 755-759, 1994;
- Journal Pharmacy and Pharmacology, 47: 66-71, 1995;
- General Pharmacology, 1995 (in press);
- Planta Medica, 1995 (in press).



## 1 - INTRODUÇÃO

As plantas têm constituído, desde a Antigüidade, um recurso ao alcance do ser humano tanto para sua alimentação como para a cura de suas enfermidades, essas últimas denominadas plantas medicinais.

Atualmente o interesse dos farmacólogos e químicos que estudam o potencial terapêutico das plantas medicinais vem aumentando de maneira expressiva não só no Brasil, mas em outros países. Esse interesse visa, em geral, investigar os efeitos terapêuticos das plantas mencionadas na medicina tradicional com o objetivo de conhecer e classificar as suas ações farmacológicas. Muitas drogas atualmente utilizadas na moderna terapêutica originaram-se a partir de síntese ou de modificações moleculares de compostos isolados de plantas medicinais.

Assim, as plantas medicinais podem representar um arsenal importante para o desenvolvimento de novas drogas a serem utilizadas no tratamento de doenças que permanecem, ainda, sem terapia adequada. No entanto, os vários compostos contidos numa planta podem apresentar efeitos benéficos, mas eventualmente podem produzir efeitos tóxicos causando alterações fisiológicas, trazendo conseqüências que muitas vezes podem ser letais. Por outro lado, a identificação dessas substâncias tóxicas pode ser de fundamental interesse como "ferramentas farmacológicas", importantes para a compreensão e a elucidação de mecanismos celulares complexos envolvidos nas ações de mediadores endógenos, que por sua vez contribuirão para a descoberta de novas armas terapêuticas.

Atualmente várias plantas preconizadas pela medicina popular estão sendo estudadas em nível farmacológico e bioquímico, com auxílio de técnicas de Biologia Molecular, na procura de novos medicamentos ou de protótipos de novas

drogas. Entretanto, a utilização de plantas na Medicina jamais perdeu seu interesse, haja vista que nos Estados Unidos, por exemplo, não menos que 24% das prescrições médicas utilizam um ou mais princípios ativos derivados de plantas e que 2,5% utilizam o seu extrato bruto (Farnsworth e Morris, 1976).

X As plantas do gênero *Phyllanthus*, pertencentes à família *Euphorbiaceae*, são amplamente distribuídas em vários continentes, exceto na Antártida, sendo constituídas por cerca de 550 espécies (Webster, 1967; Unander et al., 1990). O gênero *Phyllanthus* é composto por mais de dez subgêneros, incluindo *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Embllica*, *Conani*, *Gomphidium*, *Phyllanthodendron*, *Xylophylla*, *Botryanthus*, *Ericoccus* e *Phyllanthus* (Unander et al., 1990, 1991, 1992). O subgênero *Phyllanthus* (palavra originária do grego *Phyllon*= folhas e *anthos*= flor, significando, portanto, "flor na folha") está distribuído por todos os países tropicais, compreendendo, entre outras espécies, *P. niruri*, *P. amarus*, *P. tenellus* e *P. urinaria*, popularmente conhecidos no Brasil como "quebra-pedra".

Em virtude da complexidade que envolve essa família e o gênero, a identificação taxonômica de determinadas espécies torna-se muitas vezes complexa, e o seu enquadramento no subgênero correspondente é também uma tarefa difícil (para revisão ver Unander et al., 1995).

Recentemente, diversas espécies do gênero *Phyllanthus* vêm sendo analisadas através de estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos, permitindo comprovar e também estender o seu emprego medicinal pela população (para revisão ver Unander et al., 1995). Entre os vários efeitos biológicos dessas plantas, podem ser mencionados suas ações inibitórias, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, da replicação do vírus da hepatite B (Blumberg et al., 1989; Thyagarajan et al., 1988; Venkateswaran et al., 1987), atividade antineoplásica (Kupchan et al., 1978; Pettit et al., 1983, 1984, 1985, 1990), além de serem utilizadas na

medicina popular para o tratamento da diabetes, disenteria, icterícia, asma e infecções brônquicas e geniturinárias e nas afecções renais, incluindo os problemas relacionados aos cálculos renais e/ou biliares (Chopra et al., 1956; Perry e Metzger, 1980; Morton, 1981; Oliver-Bever, 1983; Santos, 1990).

A avaliação farmacológica pré-clínica de extrato do *P. niruri*, realizada no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, demonstrou que essa planta possui efeitos farmacológicos de interesse medicinal, especialmente no que se refere às suas ações antiespasmódicas e espasmolíticas sobre a musculatura lisa, incluindo o íleo e a bexiga de cobaia, útero de rata, ureter e artéria renal de cão (Calixto et al., 1984). Além disso, o extrato hidroalcoólico do *P. niruri*, quando administrado por via oral em ratos anestesiados, foi efetivo em inibir as contrações espontâneas da bexiga urinária (Calixto et al., 1984).

Calixto et al. (1984) demonstraram também que o chá obtido das folhas e caules do *P. sellowianus* apresentou potente atividade antiespasmódica, sendo seu efeito comparável ao produzido pela papaverina. Posteriormente foi isolado do *P. sellowianus* um novo alcalóide denominado de filantimida (Tempesta et al., 1988).

Estudos realizados por Obasi et al. (1993) demonstraram que a fração n-butanólica do *P. amarus* produziu significativa redução da motilidade gastrintestinal em ratos. Esses autores demonstraram também que a administração intraperitoneal do extrato de *P. amarus* causou diminuição do esvaziamento gástrico analisado através da redução do trânsito do carvão mineral no intestino de rato. Essa redução poderia refletir, segundo os autores, uma diminuição da atividade propulsiva gastrintestinal, efeito esse consistente com a inibição da motilidade gastrintestinal induzida pela atropina. Contudo, os estudos realizados *in vitro* no estômago e intestino de rato não foram consistentes com os obtidos

*in vivo*, devido à rápida resposta contrátil causada pelo extrato no músculo gastrointestinal. Venkateswaran et al. (1987) demonstraram que o extrato aquoso do *P. amarus* apresentou potente inibição, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, da enzima DNA polimerase do vírus da hepatite B em marmota (*Marmota monax*). O tratamento dos animais com o extrato aquoso do *P. amarus* causou desaparecimento dos antígenos de superfície viral (HBsAg) no soro de marmota infectada agudamente com o vírus da hepatite B, além de ter reduzido a níveis mínimos o antígeno no soro dos animais infectados cronicamente (Venkateswaran et al., 1987). É importante mencionar que tanto a hepatite B (humana) quanto a de marmota apresentam características biológicas comuns (Galibert et al., 1981; Millman et al., 1984), sugerindo que os princípios ativos presentes nas plantas do gênero *Phyllanthus* possam ser efetivos no tratamento da hepatite B humana. Atualmente a estratégia para o tratamento da hepatite B em humanos concentra-se em 2 áreas: a primeira está relacionada com a resposta imune endógena contra o vírus, enquanto a segunda está baseada na possibilidade de inibir determinadas rotas do ciclo da replicação viral. No entanto, a combinação das duas terapias tem sido freqüentemente sugerida como sendo mais efetiva. A infecção pelo vírus da hepatite B em humanos e a viremia (replicação viral) podem ser resolvidas espontaneamente após muitos anos ou, ao contrário, levar a hepatite fulminante com danos como cirrose e carcinoma hepatocelular (Beasley et al., 1981; Dood e North, 1987). Esse último fato tem estimulado a pesquisa de novos medicamentos ou de novas estratégias antivirais que possam ser realmente efetivas. Até o momento, nenhum tratamento utilizado produziu "resposta completa", ou seja, a inibição irreversível da replicação do vírus da hepatite B acompanhada da produção endógena de anticorpos contra marcadores virais anti-HBe e anti-HBs específicos (Thomas e Scully, 1985). Um grande número de drogas tem sido descrito como sendo potencialmente eficaz para inibir a replicação viral, contudo, essa

replicação normalmente aumenta de forma drástica após a retirada do medicamento. Esse fenômeno não está bem conhecido, mas se acredita que a combinação específica do DNA do vírus da hepatite B nos hepatócitos seja importante e essa combinação não é afetada por nenhum agente conhecido que cause a inibição da replicação viral (para revisão ver Shead et al., 1992). Todos os hepadnavírus, incluindo o vírus da hepatite B, possuem no seu genoma um gene responsável pela síntese da enzima denominada de DNA polimerase. Essa enzima está associada com o núcleo viral (Gust et al., 1986; Kaplan et al., 1973) e a sua inibição tem sido um dos alvos de pesquisas sobre novas drogas antivirais, pelo fato de estar intimamente relacionada com o processo de replicação viral. Algumas drogas como a suramina (Tsiquaye e Zuckerman, 1985) e o análogo da timidina (Wood e Geddes, 1987) causam inibição da DNA polimerase *in vitro*.

Shead et al. (1992) demonstraram que os extratos aquosos de cinco espécies de *Phyllanthus* (*P. hirtellus*, *P. gunnii*, *P. gastroemii*, *P. similis* e *P. tenellus*) encontrados na Austrália foram equipotentes em inibir a DNA polimerase do vírus da hepatite B *in vitro*. No entanto, o tratamento sistêmico de patos com o extrato de *P. gastroemii* três vezes por semana antes da infecção pelo vírus da hepatite B, ou mesmo a administração do extrato do *P. hirtellus* nos patos com hepatite B, não foi capaz de prevenir ou eliminar a infecção pelo vírus da hepatite B nesses animais (Shead et al., 1992).

Já Thyagarajan et al. (1988), em estudo realizado na Índia demonstraram, através de ensaios clínicos em pacientes portadores de hepatite B, que a administração de cápsulas contendo extrato de *P. amarus* por via oral durante 30 dias foi capaz de reduzir em cerca de 59% o antígeno de superfície do vírus da hepatite B no soro dos pacientes, quando analisados 15 a 20 dias após o término do tratamento, contra apenas 4% do grupo controle. Além disso, os autores

verificaram também que o tratamento dos pacientes com a cápsula de *Phyllanthus* não resultou em nenhum efeito tóxico, confirmando assim a ausência de toxicidade já detectada nos estudos pré-clínicos (Venkateswaran et al., 1987).

Recentemente, Ogata et al. (1992) demonstraram que o extrato de *P. niruri* causou inibição *in vitro* da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana do tipo-1 (HIV-1-RT). O composto responsável por esse efeito foi isolado e identificado como sendo o ácido repandusínico A monossódico. Além disso, esse composto foi demonstrado como sendo aproximadamente dez vezes mais efetivo em inibir a transcriptase reversa do que a DNA polimerase alfa (Ogata et al., 1992).

Dhir et al. (1990) demonstraram que os extratos de *P. emblica* e *P. niruri* causaram importante inibição do efeito clastogênico e carcinogênico induzido por metais pesados (chumbo e alumínio) em camundongos. Os autores sugeriram que esse efeito protetor decorre da presença de vários compostos nessa planta, incluindo os ácidos ascórbico, deidroascórbico, gálico, cítrico, taninos e açúcares redutores, sendo que o primeiro apresentou potente efeito antineoplásico e os taninos previniram a sua rápida oxidação (para revisão ver Dhir et al., 1990). A atividade antimutagênica dos extratos de *P. niruri* e *P. emblica* contra vários agentes foi atribuída aparentemente à combinação dos diferentes compostos presentes nessas plantas, semelhante ao demonstrado para o espinafre, que apresentou atividade antimutagênica devido à combinação da clorofila e do ácido ascórbico (Barale et al., 1983).

Singh et al. (1989) demonstraram que o efeito antiviral e hepatoprotetor causado pelo extrato de *P. niruri* foi atribuído à presença de compostos como as lignanas e de compostos acíclicos. Entretanto, o extrato contém, além de lignanas, flavonóides, alcalóides, éster do ácido ftálico, ácido graxos e vitamina C (Ueno et al., 1988). A partir do extrato obtido das folhas do *P.*

*niruri* foram isolados dois compostos: a filantina e a hipofilantina, que parecem estar relacionados, pelo menos em parte, com a atividade hepatoprotetora descrita para essa planta (Chopra et al., 1956). Além disso, foi isolado a partir do *P. niruri* o dibenzbutirolactona, que revelou atividade antitumoral (Satyanarayan et al, 1988).

Santos (1990) demonstrou, em estudos pré-clínicos realizados na Escola Paulista de Medicina, que a administração do chá de *P. niruri* (30 g/ 1 litro de água), durante 42 dias, causou significativa redução do tamanho dos discos de oxalato de cálcio (cálculo) introduzidos experimentalmente na bexiga de rato Wistar, quando comparado com o grupo controle. No entanto, esses resultados não permitiram evidenciar se a redução do cálculo urinário nos animais foi decorrente da modificação dos elementos inibidores e/ou facilitadores da sua formação, ou se o chá estaria atuando em outros fatores que poderiam estar envolvidos na gênese dos cálculos.

O mesmo autor demonstrou em estudos clínicos que a administração crônica do chá de *P. niruri* para pacientes normais não causou nenhum efeito diurético, nem efeitos tóxicos que pudessem comprometer sua utilização pela população. É digno de nota que o mesmo tratamento, com o chá, em pacientes portadores de cálculo renal, causou importante elevação da filtração glomerular e da excreção de creatinina, sendo esses parâmetros associados com significativa facilitação e eliminação dos cálculos pré-formados, acompanhados da diminuição dos episódios dolorosos de cólica nos pacientes portadores de cálculo renal (Santos, 1990). Esses resultados, em conjunto, sugerem que o *P. niruri* apresenta princípios ativos que podem atuar em diferentes processos patológicos, especialmente na gênese dos cálculos renais e/ou urinários, mas também poderiam apresentar ações analgésicas, contribuindo assim para reforçar seu uso no tratamento da litíase.

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcoólico obtido das folhas, caules e raízes do *P. corcovadensis*, administrado tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, apresentou potente atividade antinociceptiva em vários modelos de nocicepção em camundongos (Gorski et al., 1993). Foi também demonstrado, no mesmo estudo, que a ação analgésica do extrato do *P. corcovadensis* não era decorrente da inibição de produtos derivados da ciclooxigenase ou com a interação com o sistema opióide (Gorski et al., 1993). Esses resultados iniciais indicaram, portanto, que além das diversas ações já descritas nos estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos com os extratos de várias espécies do gênero *Phyllanthus*, o extrato hidroalcoólico do *P. corcovadensis* apresentava importante efeito analgésico, estendendo assim o grande interesse das plantas desse gênero para medicina popular, bem como pelo seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos.



## 2 - OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

1- Analisar o possível efeito analgésico dos extratos hidroalcoólicos (EH) de várias espécies de plantas pertencentes ao gênero *Phyllanthus*, incluindo o *P. urinaria*, *P. sellowianus*, *P. niruri* e *P. tenellus* em diferentes modelos de nocicepção em camundongos, especialmente na dor de origem neurogênica.

2- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas ações analgésicas causadas pelos extratos das espécies de *P. urinaria* e *P. niruri* com o emprego de agonistas e antagonistas específicos de vários receptores, bem como de inibidores enzimáticos conhecidos por participar da gênese da dor.

3- Analisar a ação analgésica de compostos isolados de várias espécies de *Phyllanthus* procurando também relacionar suas ações com a dor de origem neurogênica.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Animais

Foram utilizados camundongos suíços machos pesando entre 25 a 35 g, criados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, CCB, UFSC . Os animais foram mantidos à temperatura controlada ( $23 \pm 2$  °C), em ciclo claro/escuro de 12 h e tratados com água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos experimentos que foram conduzidos geralmente entre 8 h e 17 h, à temperatura de  $20 \pm 3$  °C.

#### 3.2 - Classificação botânica das várias espécies de *Phyllanthus*

O material botânico (folhas, caule e raiz) das várias espécies de *Phyllanthus*, incluindo o *P. urinaria*, *P. tenellus* e *P. niruri*, foi coletado em diferentes épocas do ano no Campus Universitário (UFSC) e classificado pela Prof<sup>a</sup>. Leila da Graça Amaral e pela bióloga Mirian Ulyssea do Departamento de Botânica (UFSC). O *P. sellowianus* (folhas e caules) foi coletado no Vale do Itajaí e classificado pelo Prof. Dr. Antônio Reis do Departamento de Botânica (UFSC). As excicatas foram depositadas no Herbário FLOR do Horto Botânico da Universidade Federal de Santa Catarina sob os números de registros 2.757, 22.741, 22.746 e 22.734, respectivamente para o *P. sellowianus*, *P. urinaria*, *P. tenellus* e *P. niruri*.

### 3.3 - Análise química

#### 3.3.1 - Preparação do extrato hidroalcoólico

Os compostos e extratos foram obtidos e preparados pelo grupo do Prof. Rosendo Augusto Yunes no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química (UFSC). As folhas, caules e raízes das espécies de *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus*, depois de secos em estufa à 40 °C, foram moídos, macerados em etanol 50% numa relação de 1:3 e mantidos em temperatura ambiente durante 15 dias. O solvente foi filtrado e evaporado. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório à pressão reduzida, à temperatura de 50 - 70 °C e mantido em freezer até o momento da utilização.

#### 3.3.2 - Isolamento dos compostos puros

Com o objetivo de isolar e identificar alguns compostos presentes nos extratos das espécies de *Phyllanthus*, os extratos hidroalcoólicos das plantas em estudo foram submetidos a partições sucessivas com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano e acetato de etila). A partir da fração de hexano, após cromatografia em coluna de sílica gel, foi feita a eluição com hexano/acetato de etila e isolada uma mistura de esteróides, posteriormente identificados como sendo o  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol e campesterol. A fração acetato de etila, após cromatografia em coluna de sílica gel e eluição com  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , foi posteriormente recromatografada em Sephadex LH-20 e eluída com  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  70:30, sendo possível isolar os compostos 1, 2 e 3, cujas estruturas não estão ainda completamente elucidadas. Os testes fitoquímicos preliminares e dados espectroscópicos (UV, IR,  $^1\text{H}$ -RMN e MS) revelaram que os compostos 1 e 3 podem ser flavonóides, enquanto o composto 2 parece tratar-se de um tanino de alto peso molecular. Todas as espécies de *Phyllanthus* apresentaram um perfil químico muito

semelhante. Entretanto, os rendimentos dos compostos ainda não estão completamente definidos. Estudos utilizando HPLC encontram-se em andamento no Departamento de Química para quantificação precisa desses constituintes e de outros que porventura venham a ser isolados.

### **3.4 - Análise farmacológica**

#### **3.4.1 - Atividade antinociceptiva**

##### **3.4.1.1 - Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético**

Preliminarmente foi verificado o efeito das várias espécies de *Phyllanthus* no teste das contorções abdominais que, embora seja um modelo de nocicepção simples e pouco específico, permite avaliar a atividade analgésica de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (0,9%). Basicamente, as contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com método descrito anteriormente (Bentley et al., 1981; Collier et al., 1968). Grupos distintos de animais foram pré-tratados com os EHS das espécies de *Phyllanthus*, ou aspirina e/ou acetoaminofen (os dois últimos utilizados como controles positivos para efeito de comparação com os EHS), ou com os compostos puros (isolados das espécies de *Phyllanthus*) por via intraperitoneal (3 - 100 mg/kg), ou oral (50 - 400 mg/kg), 30 e 60 min antes da injeção do ácido acético, respectivamente. Os grupos controles receberam o mesmo volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os extratos e/ou compostos puros.

Após a injeção do ácido acético, os camundongos foram observados em pares, colocados em funis de vidro individuais e o número de contorções abdominais foi quantificado cumulativamente durante um período de 20 min. A atividade analgésica

foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com os EHs, com os compostos isolados das diferentes espécies de *Phyllanthus* (*P. tenellus*, *P. niruri*, *P. urinaria* e *P. sellowianus*) e/ou com as ações da aspirina ou acetoaminofen, administrados por via oral ou intraperitoneal, comparados com o número das contorções abdominais dos animais controles (salina).

#### 3.4.1.2 - Dor induzida pela formalina

Para confirmação do efeito analgésico das espécies de *Phyllanthus*, utilizamos o teste da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina, um modelo mais específico que o teste de contorções abdominais, que permite avaliar dois tipos de dor: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a dor inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O procedimento utilizado foi similar ao descrito anteriormente (Corrêa e Calixto, 1993; Hunskaar et al., 1985, 1986; Murray et al., 1988). Os animais receberam 20  $\mu$ l de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) ou salina na região intraplantar da pata posterior direita e esquerda, respectivamente.

Logo após a injeção de formalina os animais foram colocados, individualmente, dentro de um funil de vidro, ao lado de um espelho para facilitar a observação. Após foi medido, durante 30 min, o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina, sendo esse tempo cronometrado e considerado como indicativo de dor. Esse modelo permite evidenciar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção da formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda, que ocorre entre 15 a 30 min após a formalina, representando a resposta tônica à dor acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada com a liberação de

mediadores inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987).

Os animais foram tratados com os EHs das espécies de *P. tenellus*, *P. niruri*, *P. urinaria* e *P. sellowianus* por via oral (12 - 400 mg/kg) ou intraperitoneal (0,3 - 100 mg/kg), 60 e 30 min antes da injeção da formalina, respectivamente. Grupos distintos de animais foram tratados intraperitonealmente com aspirina, indometacina, acetoaminofen, ou com os compostos isolados da espécie de *Phyllanthus*: stigmasterol, composto 1, composto 2 e composto 3 (ainda não identificados) (1 - 100 mg/kg), 30 min antes da injeção da formalina. Os animais controles receberam igual volume dos veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir os EHs, os compostos isolados das espécies de *Phyllanthus* ou as drogas padrão. Ao final do tempo de observação, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e as patas posteriores foram cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança analítica para quantificação do edema induzido pela formalina. A diferença entre o peso (em mg) da pata direita (injetada com formalina) e a pata esquerda (injetada com salina) foi considerada como índice do edema.

#### 3.4.1.3 - Teste do tail-flick

A atividade analgésica dos extratos das várias espécies de *Phyllanthus* foi a seguir analisada no teste do tail-flick, um modelo de dor muito sensível para drogas que atuam centralmente, como a morfina e seus derivados. Foi utilizado o aparelho do tail-flick (Albarsch, model Tail-flick analgesia meter) para medir o tempo de reação (s) à exposição do feixe de luz (90 W) incidido sobre a cauda dos animais, de acordo com o método descrito previamente por D'Amour e Smith (1941), com pequenas modificações.

Os animais foram selecionados 24 horas antes dos experimentos conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 8 s no

aparelho. Os animais normalmente respondem ao estímulo térmico (feixe luminoso, 90 W) movendo sua cauda, expondo assim uma fotocélula localizada na base do aparelho, que controla o tempo em que o animal permanece com o feixe de luz incidido sobre sua cauda. Os animais foram pré-tratados com os EHs do *P. tenellus*, *P. urinaria*, *P. niruri* e *P. sellowianus* por via oral (500 mg/kg), ou com morfina (10 mg/kg, s.c.), que foi utilizada como controle positivo, administrados 60 e 30 min antes do experimento, respectivamente. O tempo máximo permitido de permanência do estímulo nocivo sobre a cauda do animal foi de 20 s para não causar danos teciduais aos animais, o qual foi considerado como índice total de analgesia. O grupo controle recebeu o mesmo volume de veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os EHs ou morfina.

#### 3.4.1.4 - Teste da placa-quente

O teste da placa-quente possui, de maneira geral, as mesmas características e sensibilidade que o modelo do tail-flick, ou seja, as drogas que apresentam efeito analgésico no tail-flick geralmente são ativas no teste da placa-quente. Os animais foram colocados dentro de um cilindro de vidro sobre a superfície de uma placa de metal previamente aquecida à  $56 \pm 1$  °C utilizando-se o aparelho de placa quente (Ugo Basile, Modelo-DS 37). O tempo em segundos que o animal levou para lamber, morder ou levantar as patas dianteiras sobre a placa previamente aquecida foi cronometrado e considerado como indicativo de efeito nociceptivo, conforme descrito anteriormente (Eddy e Leimback, 1953). Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos de acordo com sua reatividade ao modelo, sendo desprezados aqueles que permaneceram acima de 8 s na placa aquecida sem reagir ao estímulo térmico.

Os animais foram pré-tratados com os EHs das espécies de *Phyllanthus* por

via oral (500 mg/kg), ou com morfina (10 mg/kg, s.c., utilizada para comparar com o efeito dos EHs) 60 e 30 min antes do experimento, respectivamente. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho de placa quente foi de 30 s, para não causar danos teciduais aos animais, sendo considerado como índice total de analgesia. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os EH das espécies de *Phyllanthus* ou morfina.

#### 3.4.1.5 - Efeito sobre a performance motora (rota-rod)

O objetivo deste teste foi evidenciar o possível efeito depressor dos EHs das várias espécies de *Phyllanthus* sobre o sistema nervoso central ou periférico. Os animais foram analisados no teste do rota-rod, que permite evidenciar o possível efeito do extrato ou composto sobre a performance motora, independente de atuar em nível de sistema nervoso central ou periférico.

Cada animal foi selecionado 24 horas antes dos experimentos, sendo eliminados aqueles que não permaneceram sobre o aparelho de rota-rod (constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro, subdividida em 6 compartimentos girando a 14 r.p.m., colocada a 25 cm de altura) por, pelo menos, dois períodos consecutivos de 60 s cada, conforme descrito por Duham e Miya (1957). Os animais selecionados foram tratados por via oral com os EHs das espécies de *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus* na dose de 500 mg/kg, 60 min antes ou com o veículo (10 ml/kg) utilizado para diluir os extratos. A seguir, os animais foram analisados no aparelho de rota-rod, por um período de 60 s, em vários intervalos de tempo (15, 30 e 60 min) após o tratamento com os EHs das várias espécies de *Phyllanthus* ou com o veículo.



#### 3.4.1.6 - Dor induzida pela capsaicina

Esse modelo foi proposto recentemente por Sakurada et al. (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurôgenica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) (Sakurada et al., 1992; 1993). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação dos extratos ou dos compostos isolados das espécies de *Phyllanthus* com o sistema taquicinérgico.

Cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente por um período de adaptação de, no mínimo, 20 min que, posteriormente, foi utilizado para observar a reação à dor induzida pela capsaicina, cronometrando-se durante 5 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata. Cada animal recebeu 20  $\mu$ l de solução de capsaicina (1,6  $\mu$ g/pata), injetada na região intraplantar da pata posterior direita. O tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina foi considerado como indicativo de dor (Sakurada et al., 1992; 1993). Os animais foram tratados com o EH de *P. urinaria* e *P. niruri* por via oral (25 - 200 mg/kg) ou intraperitoneal (1 - 30 mg/kg), 60 e 30 min antes da injeção da capsaicina, respectivamente. Outros grupos de animais foram tratados por via intraperitoneal com dipirona, indometacina ou com os compostos 1, 2 e 3 isolados das espécies de *Phyllanthus* (1 - 100 mg/kg), ou subcutaneamente com morfina (0,5 - 2,5 mg/kg), 30 min antes da injeção de capsaicina. O grupo controle recebeu somente os veículos (10 ml/kg) utilizados para diluir as drogas, os compostos e os EHs das espécies de *Phyllanthus*.

### 3.5 - Estudo do possível mecanismo de ação analgésica dos extratos das diversas espécies de *Phyllanthus*

#### 3.5.1 - Efeito do tratamento com naloxona

Com o objetivo de avaliar a participação do sistema opióide sobre o efeito analgésico dos extratos das espécies de *Phyllanthus*, os animais foram pré-tratados com antagonista opióide não seletivo, naloxona (5 mg/kg, i.p.), 15 min antes da administração dos EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.), ou da injeção de morfina (5 mg/kg, s.c., utilizada como controle positivo). Decorridos 30 min após a administração dos extratos ou morfina, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à segunda fase da dor induzida pela injeção intraplantar de formalina. Os grupos utilizados como controles foram tratados com o EHs de *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir os extratos e a morfina, 30 min antes da injeção da formalina.

#### 3.5.2 - Efeito do tratamento com prazosin e ioimbina

Para avaliar a participação dos alfa-adrenoceptores na ação analgésica induzida pelos EHs das espécies de *Phyllanthus*, os animais foram tratados com os antagonistas de adrenoceptores  $\alpha_1$  (prazosin; 0,15 mg/kg, i.p.) e  $\alpha_2$  (ioimbina; 0,15 mg/kg, i.p.). Decorridos 15 min, os animais receberam os EHs de *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou os agonistas dos adrenoceptores  $\alpha_1$  (fenilefrina; 10 mg/kg, i.p.) ou  $\alpha_2$  (clonidina; 0,1 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após a administração dos extratos e/ou drogas, foi avaliado o efeito desse tratamento em relação à segunda fase da dor induzida pela injeção de formalina em camundongos. Os grupos controles receberam somente *P. urinaria* (10

mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.), os agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, fenilefrina (10 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.), ou os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir os extratos e as drogas, 30 min antes da injeção de formalina.

### 3.5.3 - Efeito do tratamento com L-arginina

Com o objetivo de avaliar o possível envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito analgésico causado pelos extratos das espécies de *Phyllanthus*, os animais receberam o precursor do óxido nítrico, L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e, decorridos 15 min, foram tratados com os EHs de *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p., inibidor da enzima óxido nítrico sintase). Decorridos 30 min após o tratamento, os animais foram analisados em relação à segunda fase da dor induzida pela injeção de formalina. Os animais controles foram tratados com os EHs de *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.), L-NOARG (75 mg/kg, i.p.) ou com os veículos (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

### 3.5.4 - Efeito do tratamento com p-clorofenilalanina e metisergida.

Visando investigar a possível participação do sistema serotoninérgico na ação analgésica dos extratos das espécies de *Phyllanthus*, outros grupos de animais foram pré-tratados com metisergida (5 mg/kg, i.p., antagonista serotoninérgico não seletivo) ou com p-clorofenilalanina (100 mg/kg, i.p. 1 vez ao dia, durante 4 dias), inibidor da síntese de serotonina. Transcorridos 30 min após o último tratamento, os animais receberam os EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou somente os veículos (10 ml/kg, i.p.) utilizados para diluir os extratos e drogas. Passados 30 min, os animais foram analisados em

relação à segunda fase da dor do modelo da formalina. Os animais controles receberam os EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou somente o veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina.

### 3.5.5 - Efeito dos glicocorticóides endógenos

A fim de eliminar a possível participação dos glicocorticóides endógenos na ação analgésica causada pelos vários EHs das espécies de *Phyllanthus*, os animais foram adrenalectomizados bilateralmente através de incisão dorsal, sob anestesia de éter. Decorridas 2 semanas após a cirurgia, os animais receberam os EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou somente o veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento, analisou-se a reação em relação à segunda fase da dor induzida pela injeção de formalina. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, no entanto não foram retiradas as adrenais (falso-operados) e 2 semanas após receberam *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.), *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) ou somente o veículo (10 ml/kg, i.p.), 30 min antes da injeção da formalina. Os animais adrenalectomizados foram hidratados com solução de NaCl (0,9%) e os falso-operados com água normal durante o decorrer da experimentação.

### 3.6 - Drogas e soluções usadas

As seguintes drogas e soluções foram utilizadas: ácido acético, formalina, hidrocloreto de morfina (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), N<sup>o</sup>-nitro-L-arginina (L-NOARG), L-arginina, hidrocloreto de ioimbina, hidrocloreto de clonidina, hidrocloreto de p-clorofenilalanina-metil-éster (PCPA), hidrocloreto de fenilefrina, dipirona, indometacina, aspirina, acetoaminofen (Sigma Chemical CO., St Luis, MO. EUA), dimaleato de metisergida (Sandoz AG, Basel, Suíça), capsaicina

(Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA), prazosin (Pfizer, Nova Iorque, EUA), hidrocloreto de naloxona (Dupont, Garden City, EUA). Os demais reagentes e sais utilizados foram de alto grau de pureza analítica e procedência Merck. Todas as drogas utilizadas foram dissolvidas em salina antes do seu uso, exceto indometacina, aspirina e acetoaminofen e capsaicina, que foram dissolvidas em carbonato de sódio (0,5%), salina contendo 0,5% de tween 80 e etanol absoluto, respectivamente. A capsaicina foi mantida em freezer na concentração de 1 mM, sendo dissolvida em salina antes do uso.

### 3.7 - Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média, exceto as  $DI_{50}$ s (doses das drogas, compostos ou extratos que reduziram a resposta a 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95% (Fleming et al., 1972). As análises estatísticas dos resultados foram realizadas por meio de análise de variância seguida pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Dunnett e/ou Newman-Kuels, quando apropriado. Valores de  $P < 0.05$  ou menos foram considerados como indicativos de significância. As  $DI_{50}$ s foram estimadas a partir de experimentos individuais por interpolação gráfica em papel semilogaritmo.

## 4 - RESULTADOS

### 4.1 - Dor induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético

Os resultados apresentados nas figuras 1 e 2 (A e B) mostram que os EHs do *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus* administrados por via intraperitoneal (3 - 90 mg/kg) ou por oral (50 - 400 mg/kg) causaram inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. As  $DI_{50}$ s (juntamente com os intervalos de confiança) foram de 5,4 (4,3 - 6,8), 8,5 (5,5 - 13,2), 18,2 (11,0 - 30,0) e 53,0 (45,0 - 61,0) mg/kg, quando os EHs foram administrados por via intraperitoneal, com inibição máxima (IM) de  $80 \pm 2$ ,  $67 \pm 8$ ,  $63 \pm 8$  e  $50 \pm 4\%$ , respectivamente para o *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus*. Quando os EHs foram administrados por via oral, foram cerca de 10 a 20 vezes menos potentes. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) determinadas foram: 210,0 (125,0 - 353,0) > 200 > 400 e > 400 e as IM (%) foram de  $56 \pm 8$ ,  $26 \pm 4$ ,  $29 \pm 5$  e  $45 \pm 7\%$ , para *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. sellowianus* e *P. tenellus*, respectivamente.

A administração da aspirina ou do acetoaminofen (10 - 100 mg/kg, i.p.) 30 min antes também causou inibição dose-dependente das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético com  $DI_{50}$ s de 24,0 (13,1 - 43,8) e 18,8 (15,7 - 22,6) mg/kg e IM (%) de  $83 \pm 2$  e  $88 \pm 1$ , respectivamente (tabela 1). Quando essas drogas foram administradas por via oral (50 - 300 mg/kg), 60 min antes, também causaram potente efeito analgésico com  $DI_{50}$ s de 109,0 (93,0 - 127,0) e 173,0 (107,0 - 279,0) mg/kg e IM (%) de  $82 \pm 5$  e  $59 \pm 4$ , respectivamente para a aspirina e acetoaminofen (tabela 1).

As ações antinociceptivas dos EHs de *P. urinaria*, *P. niruri*, *P. tenellus* e *P. sellowianus*, administrados intraperitonealmente, foram de longa duração (2 - 4 horas), quando analisadas no modelo de dor induzida pelo ácido acético (tabela 2).

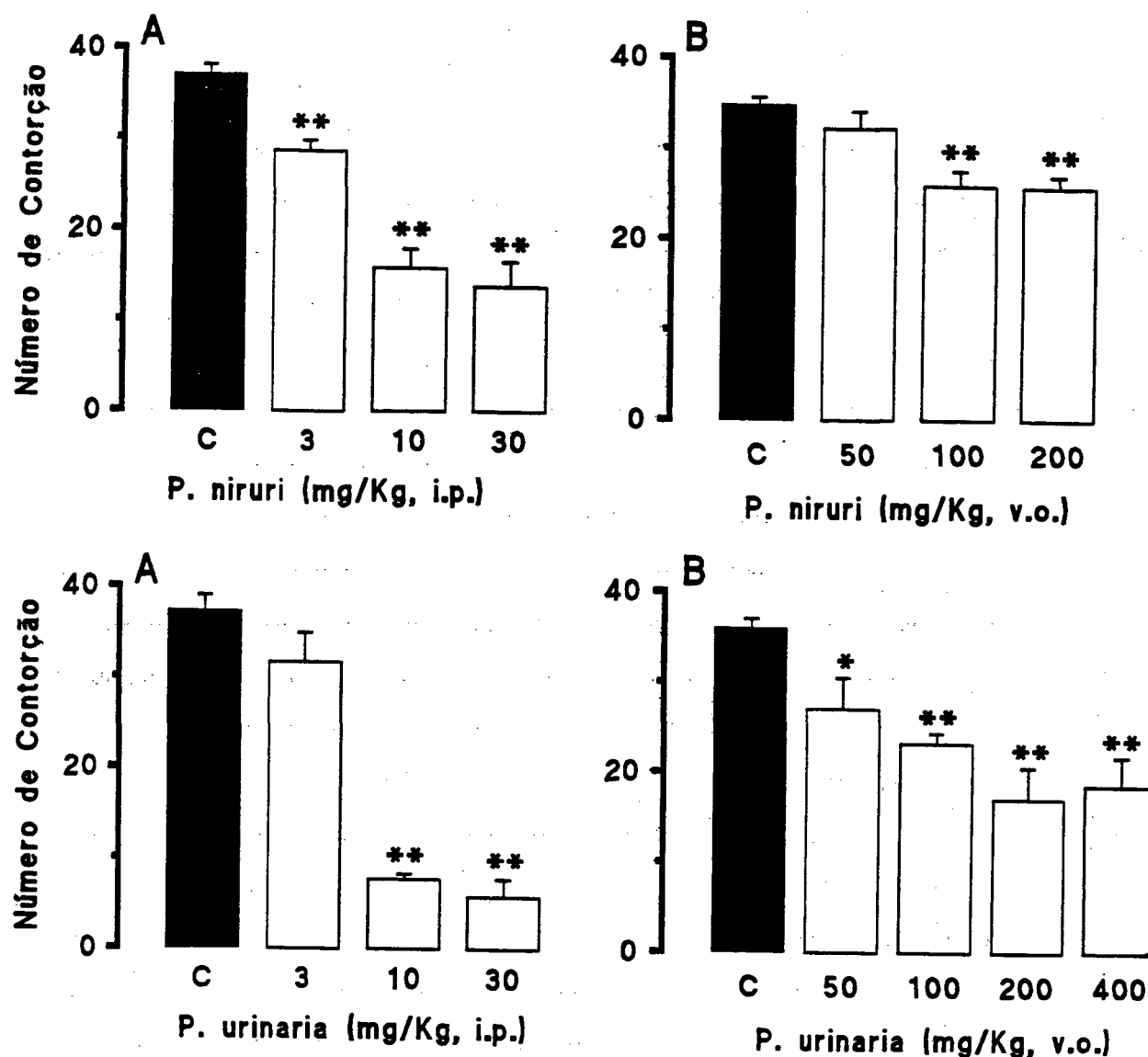


FIGURA 1 - Efeito analgésico causado pelos EHs do *P. niruri* (painel superior) e *P. urinaria* (painel inferior) administrados por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

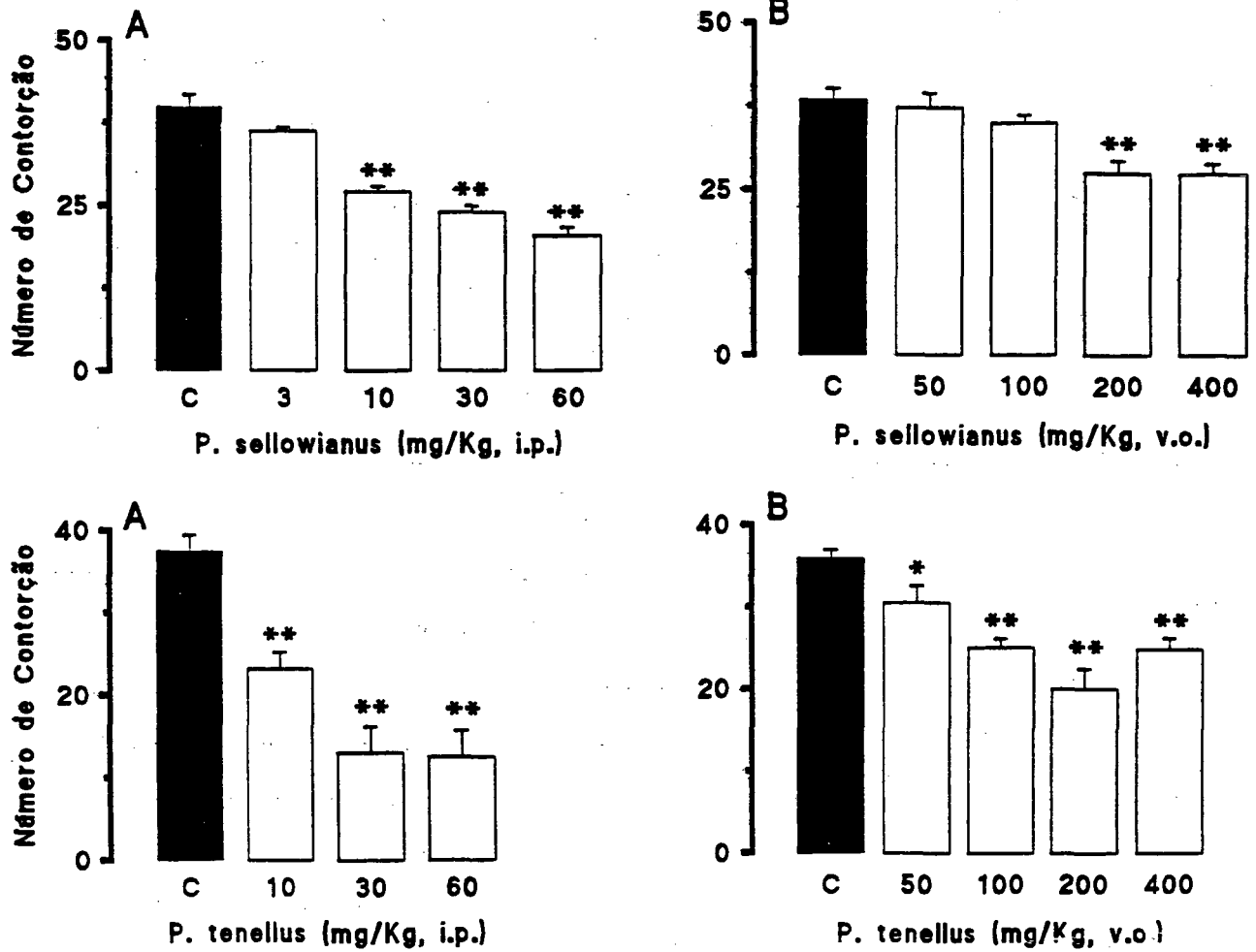


FIGURA 2 - Efeito analgésico causado pelos EH do *P. sellowianus* (painel superior) e *P. tenellus* (painel inferior) administrados por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



Tabela 1 - Efeito analgésico causado pela aspirina e acetoaminofen administrados por via intraperitoneal ou por via oral sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos.

Tratamento	Número de contorções abdominais			
	Dose (mg/kg)	Via intraperitoneal	Dose (mg/kg)	Via oral
Aspirina	0	33.3 ± 1.4	0	33.6 ± 1.6
	10	21.2 ± 1.6**	50	24.5 ± 1.1**
	30	9.75 ± 1.6**	100	16.0 ± 1.0**
	100	5.7 ± 1.5**	200	12.3 ± 0.7**
	-	-	300	4.5 ± 1.5**
Acetoaminofen	0	33.3 ± 1.4	0	32.0 ± 0.8
	10	20.6 ± 1.2**	50	24.0 ± 1.1**
	30	10.7 ± 2.1**	100	18.0 ± 1.1**
	100	4.0 ± 1.0**	300	12.8 ± 1.4**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 - 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle, \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 2 - Efeito analgésico tempo-dependente dos extratos hidroalcoólicos das várias espécies de *Phyllanthus* administrados intraperitonealmente sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Tempo (h)	Número de contorções abdominais			
	Extrato hidroalcoólico			
	<i>P. urinaria</i> (30 mg/kg)	<i>P. tenellus</i> (30 mg/kg)	<i>P. niruri</i> (30 mg/kg)	<i>P. sellowianus</i> (60 mg/kg)
0	34.2 ± 2.2	34.2 ± 2.2	34.2 ± 2.2	38.4 ± 1.4
0.5	7.7 ± 0.7**	12.6 ± 1.6**	13.6 ± 1.0**	20.0 ± 1.7**
1.0	14.3 ± 2.9**	18.6 ± 1.2**	15.3 ± 1.4**	20.3 ± 1.4**
2.0	21.6 ± 0.7**	26.0 ± 1.4*	15.3 ± 2.4**	23.6 ± 1.5**
3.0	29.3 ± 1.2	31.3 ± 2.9	23.0 ± 1.6**	32.0 ± 2.0
3.5	35.6 ± 0.7	34.3 ± 1.6	29.2 ± 1.2	31.3 ± 1.9
4.0	-	-	31.0 ± 0.8	37.0 ± 0.7

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 - 6 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.2 - Dor induzida pela formalina

Os resultados representados nas figuras 3, 4, 5 e 6 (A e B) mostram que os EHs das espécies de *Phyllanthus* (0,3 - 90 mg/kg, i.p.) causaram inibição dose-dependente sobre ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo contudo mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) para a primeira fase foram: 20,0 (16,1 - 24,3), 23,0 (16,0 - 34,0), >90 >90. As IMs (%) observadas foram de 70 ± 2, 63 ± 1, 42 ± 3 e 46 ± 4%, respectivamente para os

extratos de *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri* e *P. sellowianus*. Todavia, todos os extratos foram mais ativos em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) obtidas pela injeção intraperitoneal dos EHs foram de: 0,71 (0,48 - 0,92), 4,8 (4,1 - 5,7), 7,7 (5,5 - 10,6), 33,0 (26,0 - 42,0) e as IM (%) foram de  $91 \pm 6$ ,  $97 \pm 3$ ,  $97 \pm 3$  e  $92 \pm 6$ , respectivamente para o *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri* e *P. sellowianus*.

A administração oral dos EHs causou também inibição de ambas as fases da dor induzida pela formalina. Novamente, os EHs foram mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) para a primeira fase foram de  $> 400$ ,  $> 200$ ,  $> 400$ ,  $> 400$  e IM (%) de  $44 \pm 6$ ,  $42 \pm 3$ ,  $37 \pm 4$  e  $37 \pm 4$  para *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. sellowianus* e *P. niruri*, respectivamente. As  $DI_{50}$ s para a segunda fase foram: 20,0 (16,0 - 25,0), 44,0 (35,0 - 55,0), 41,0 (33,0 - 48,0), 56,5 (41,7 - 76,7) mg/kg e as IMs (%) foram de  $70 \pm 1$ ,  $71 \pm 5$ ,  $92 \pm 3$  e  $77 \pm 6\%$ , respectivamente para *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. sellowianus* e *P. niruri*. Porém, os EHs das várias espécies de *Phyllanthus*, nas mesmas doses que inibiram a dor induzida pela formalina, não causaram redução significativa do edema da pata de camundongo associado à segunda fase da dor desse modelo (figuras 3, 4, 5 e 6 C).

Ao contrário do observado para os diversos EHs, a indometacina, aspirina e o acetoaminofen (1 - 100 mg/kg, i.p.) apresentaram potente e dose-dependente efeito analgésico apenas em relação à segunda fase da dor à formalina com as seguintes  $DI_{50}$ s (mg/kg) de 4,8 (3,7 - 6,3), 18,1 (13,6 - 24,3), 22,1 (13,8 - 37,6) e IMs (%) de  $64 \pm 4$ ,  $85 \pm 4$  e  $88 \pm 3$ , respectivamente (tabelas 3, 4 e 5). No entanto, apenas a indometacina causou redução significativa do edema da pata associado à segunda fase da dor induzida pela formalina com inibição de  $34 \pm 6\%$  (tabelas 3 e 4).

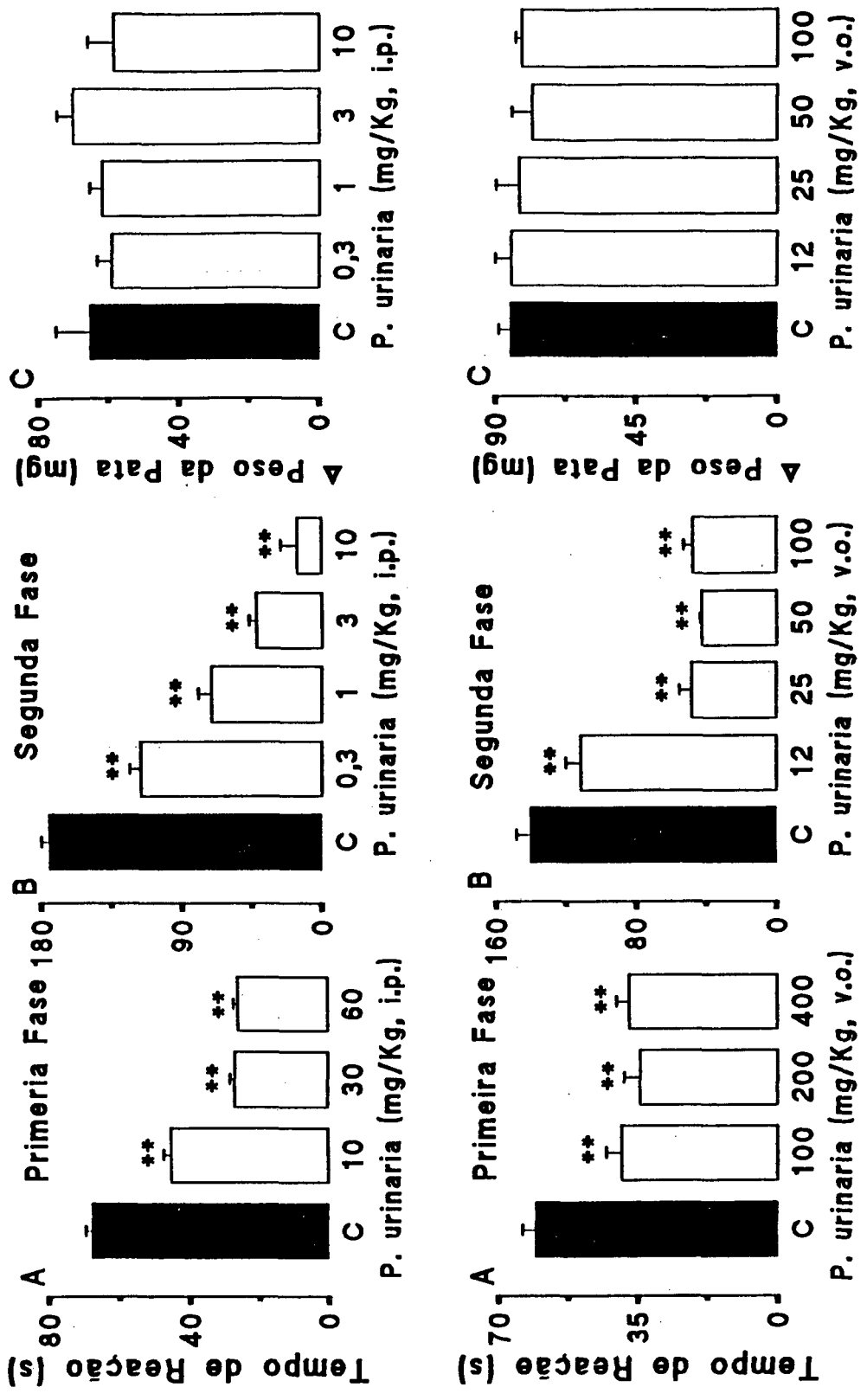


FIGURA 3 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. urinaria* administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou por via oral (painel inferior) em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\* $P < 0,01$ .

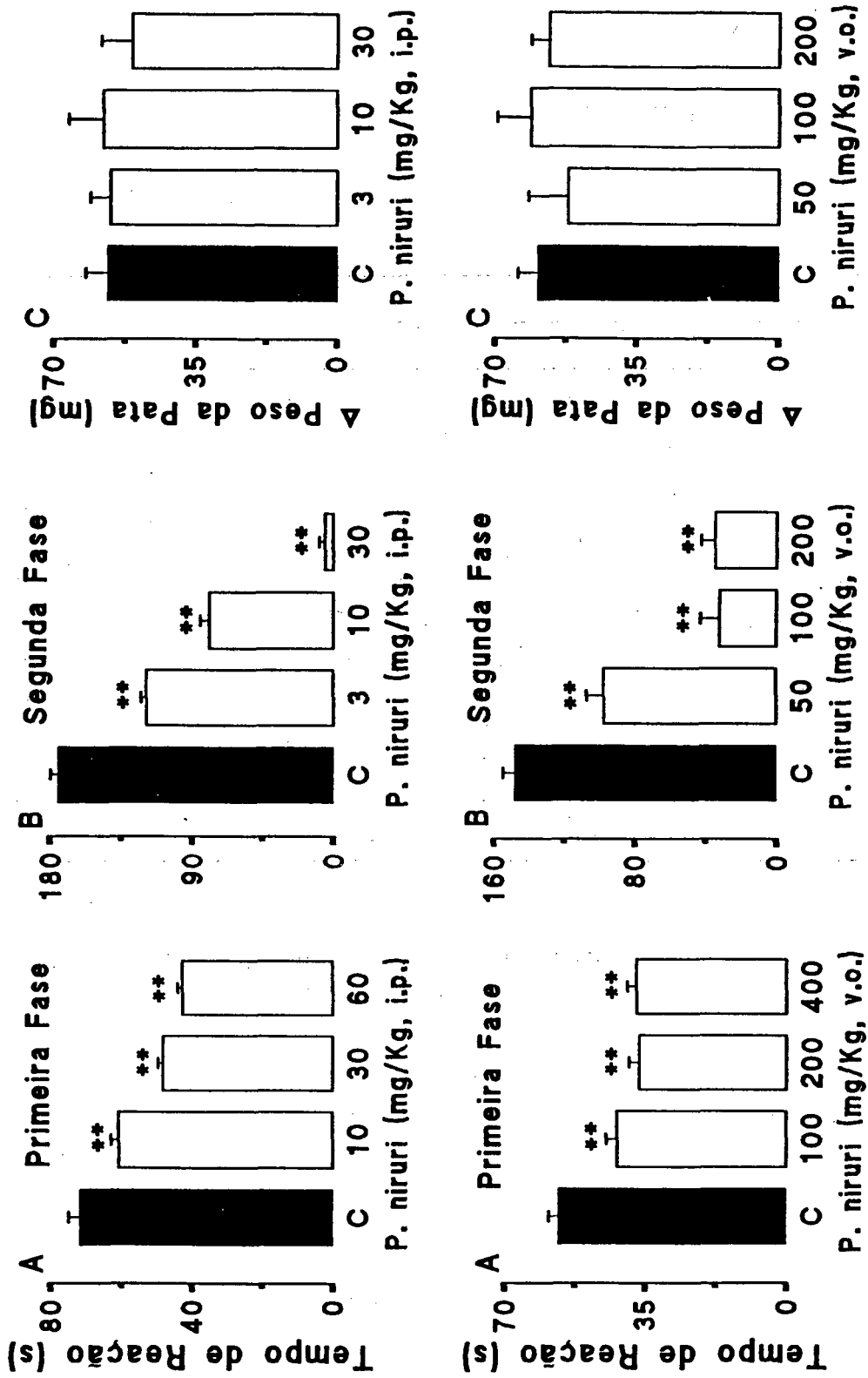


FIGURA 4 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. niruri* administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou por via oral (painel inferior) em relação a primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

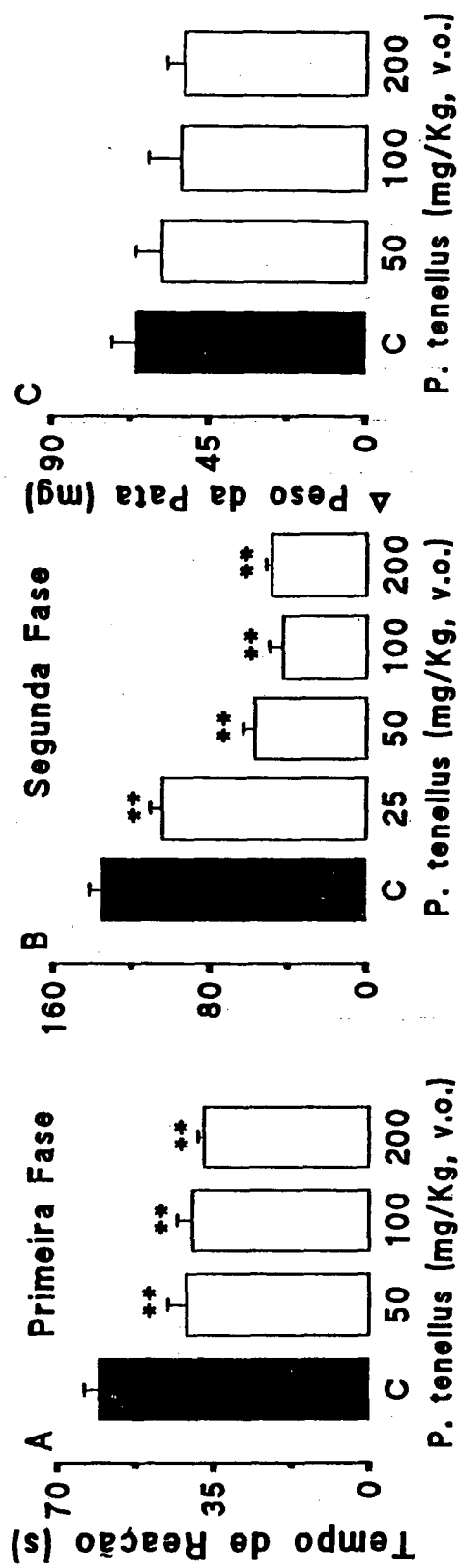
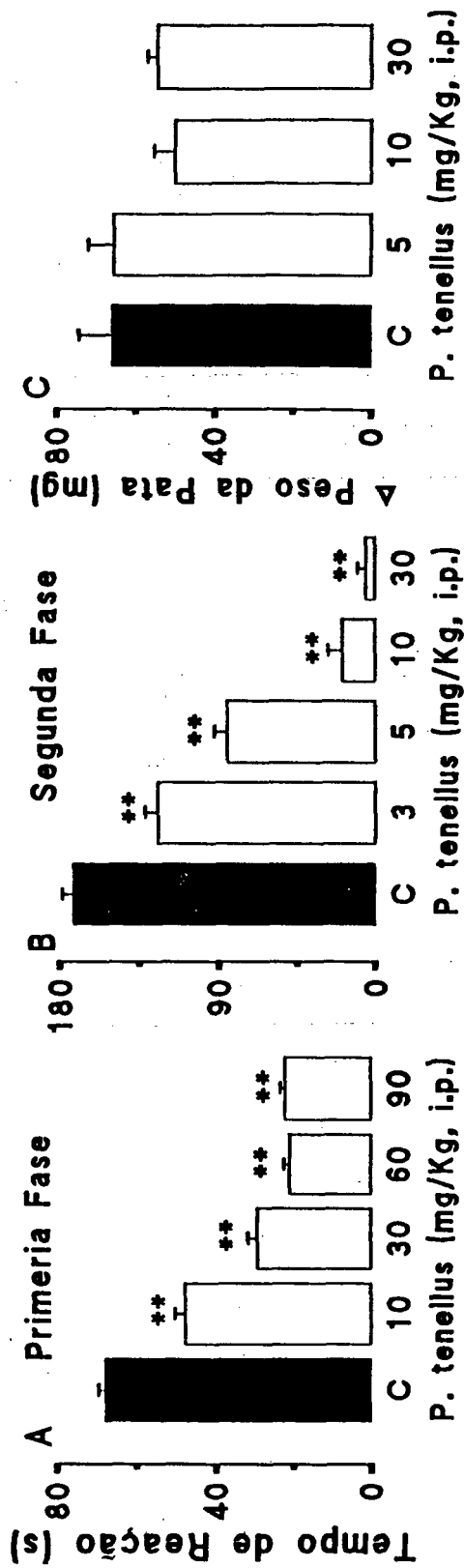


FIGURA 5 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. tenellus* administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou por via oral (painel inferior) em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\* $P < 0,01$ .

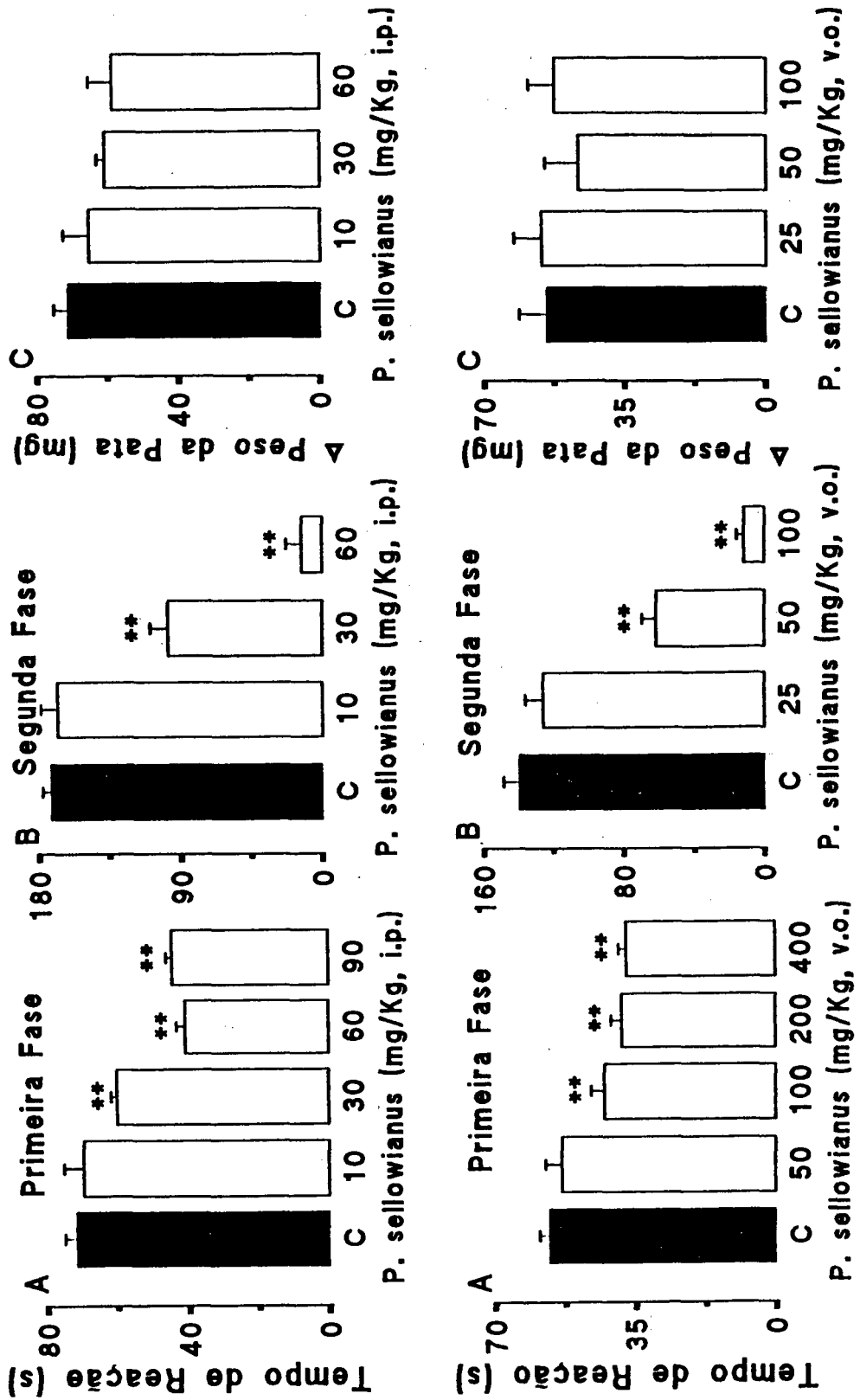


FIGURA 6 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. sellowianus* administrado por via intraperitoneal (painel superior) ou por via oral (painel inferior) em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\* $P < 0,01$ .

Tabela 3 - Efeito da aspirina administrada por via intraperitoneal ou por via oral em relação à primeira (0 - 5 min) e à segunda fase (15 - 30 min) da dor e sobre o edema de pata, induzidos pela injeção de formalina em camundongos.

Aspirina (mg/kg)	Tempo de reação (s)		Δ Peso da Pata (mg)
	0 - 5 min	15 - 30 min	
Intraperitoneal			
0	84.4 ± 2.0	116.2 ± 3.9	44.0 ± 6.1
10	69.8 ± 2.0	71.2 ± 4.0**	40.0 ± 4.9
30	71.1 ± 0.9	63.3 ± 3.3**	40.0 ± 3.0
60	69.8 ± 2.5	41.7 ± 8.2**	44.0 ± 3.6
100	-	14.5 ± 2.6**	48.6 ± 2.6
Oral			
0	65.4 ± 2.8	155.3 ± 7.3	76.8 ± 4.7
100	65.8 ± 4.9	138.1 ± 5.4	70.9 ± 2.5
200	59.9 ± 4.3	99.3 ± 8.3**	65.4 ± 5.0
400	60.1 ± 2.6	52.1 ± 11.2**	57.6 ± 3.2*
600	-	14.4 ± 2.6**	56.7 ± 3.8*

Cada grupo representa a média ± E.P.M. 6 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .



Tabela 4 - Efeito do acetoaminofen e da indometacina administrados por via intraperitoneal em relação à primeira (0 - 5 min) e à segunda fase (15 - 30 min) da dor e sobre o edema de pata, induzidos pela injeção de formalina em camundongos.

Drogas (mg/kg, i.p.)	Tempo de reação (s)		Δ Peso da Pata (mg)
	0 - 5 min	15 - 30 min	
<b>Acetoaminofen</b>			
0	81.3 ± 3.0	129.2 ± 8.7	50.0 ± 4.9
10	74.0 ± 1.7	80.4 ± 7.3**	40.0 ± 3.0
30	69.4 ± 2.8	56.4 ± 5.7**	48.0 ± 3.6
60	72.4 ± 3.0	36.0 ± 3.2**	42.6 ± 3.3
100	-	19.1 ± 3.8**	47.8 ± 1.8
<b>Indometacina</b>			
0	63.5 ± 5.0	137.8 ± 11.0	65.0 ± 2.0
1	61.0 ± 4.0	154.2 ± 7.7	66.0 ± 5.0
3	56.5 ± 6.0	81.3 ± 4.3**	56.0 ± 4.0*
10	70.1 ± 5.0	56.6 ± 6.3**	44.0 ± 3.0**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

### 4.3 - Dor induzida pela capsaicina

O tratamento dos animais com os EHs do *P. urinaria* e *P. niruri* (1 - 30 mg/kg, i.p.) causou inibição dose-dependente da dor causada pela injeção intraplantar de capsaicina (1,6  $\mu$ g/pata) (figura 7 A). Os EHs do *P. sellowianus* e *P. tenellus* não foram testados nesse modelo. As  $DI_{50}$ s calculadas foram: 2,1 (1,7 - 2,5) e 6,1 (3,8 - 9,9) mg/kg, com IM (%) de  $69 \pm 4$  e  $61 \pm 4$  para os EHs do *P. urinaria* e *P. niruri*, respectivamente. Quando os EHs foram administrados por via oral (25 - 200 mg/kg), também causaram inibição dose-dependente no modelo da capsaicina com as seguintes  $DI_{50}$ s: 39,0 (37,0 - 42,0) e 35,0 (29,0 - 42,0) mg/kg e IM (%) de  $68 \pm 6$  e  $75 \pm 4$ , para os EHs de *P. urinaria* e *P. niruri*, respectivamente (figura 7 B). É interessante notar que a indometacina, administrada por via intraperitoneal (1 - 10 mg/kg), foi completamente destituída de efeito analgésico nesse modelo (figura 8 A). Ao contrário, a morfina (0,5 - 2,5 mg/kg, s.c.) e a dipirona (10 - 100 mg/kg, i.p.) apresentaram inibição dose-dependente da dor induzida pela capsaicina com as seguintes  $DI_{50}$ s: 1,0 (0,8 - 1,3) e 47,0 (38,0 - 58,0) com IM (%) de  $89 \pm 8$  e  $72 \pm 7$ , respectivamente (figura 8 B e C).

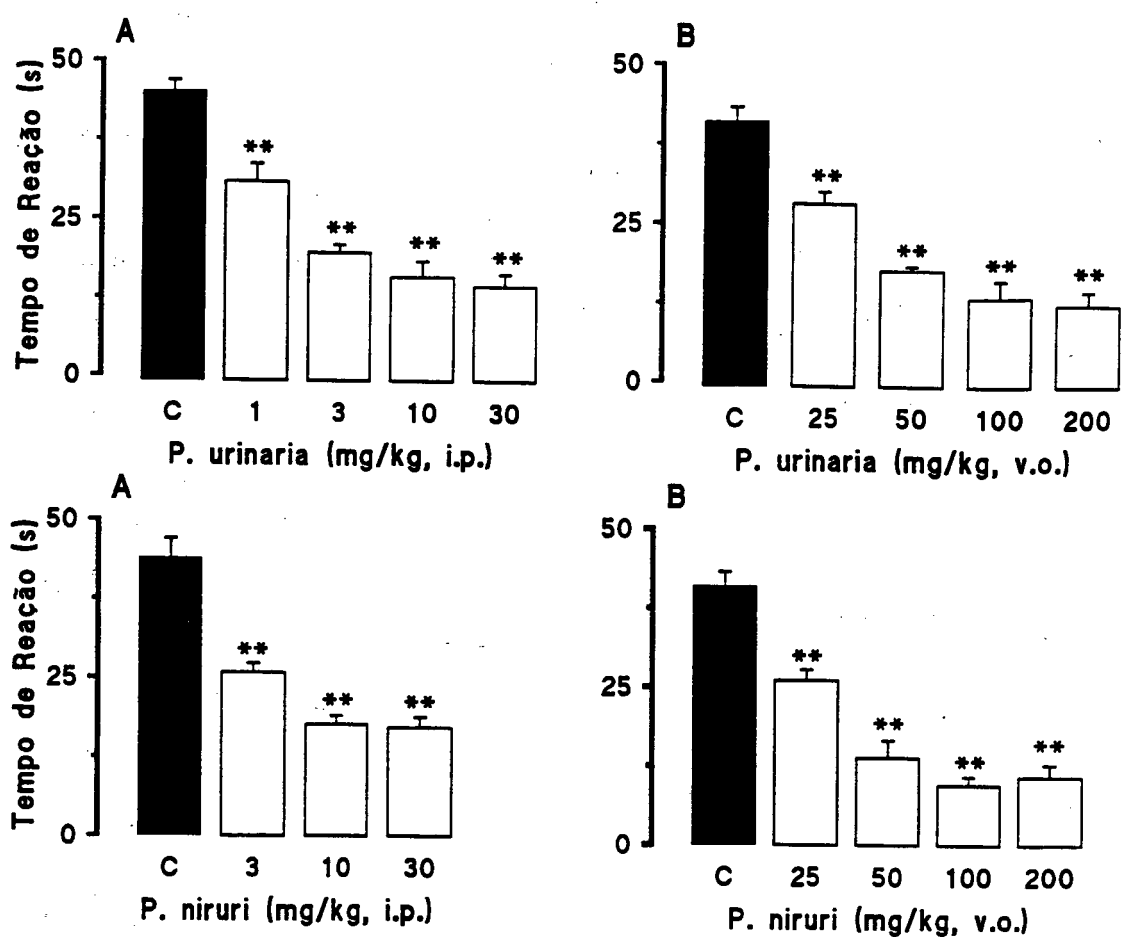


FIGURA 7 - Efeito analgésico causado pelo EH do *P. urinaria* (painel superior) e *P. niruri* (painel inferior) administrado por via intraperitoneal (A) ou por via oral (B) em relação à dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), **\*\* $P < 0,01$** .

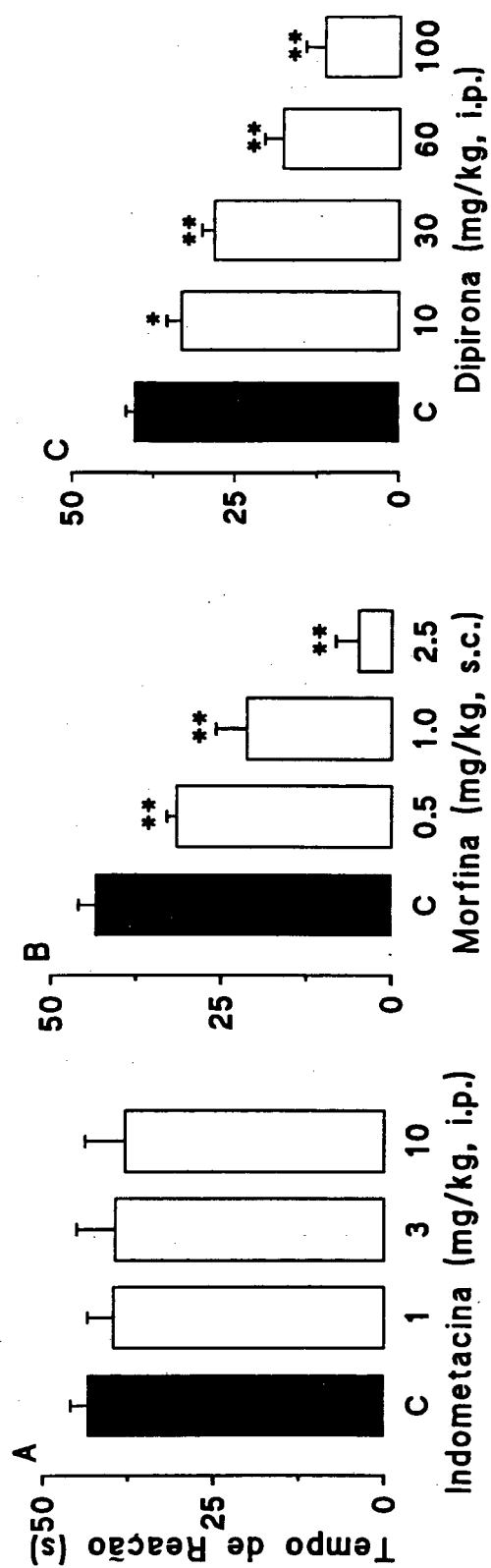


FIGURA 8 - Efeito analgésico causado pela indometacina (A), morfina (B) ou dipirona (C) administradas por via intraperitoneal em relação à dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.4 - Efeito dos EHs das várias espécies de *Phyllanthus* nos teste do tail-flick e placa quente

O tratamento dos animais com os EHs das várias espécies de *Phyllanthus* administrados por via oral na dose de 500 mg/kg (dose 5 a 10 vezes maior que as necessárias para causar analgesia), não causou nenhum efeito analgésico quando analisado nos testes de tail-flick e da placa-quente (tabela 5). Ao contrário, o tratamento dos animais com morfina (10 mg/kg, s.c.) 30 min antes causou potente efeito analgésico nos dois modelos (tabela 5).

Tabela 5 - Efeito do tratamento com morfina (s.c.) ou com os extratos hidroalcoólicos (v.o.) das várias espécies de *Phyllanthus* no teste da placa-quente e tail-flick em camundongos.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Latência (s)	
		Placa-quente	Tail-Flick
Controle	0	4.5 ± 0.5	5.1 ± 0.3
<i>P. tenellus</i>	500	4.3 ± 0.3	5.5 ± 0.6
<i>P. niruri</i>	500	4.1 ± 0.6	5.3 ± 0.5
<i>P. sellowianus</i>	500	4.1 ± 0.6	5.0 ± 0.3
<i>P. urinaria</i>	500	4.0 ± 0.6	5.3 ± 0.5
Morfina	10	23.9 ± 1.5**	19.4 ± 0.6**

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

Difere significativamente em relação ao grupo controle, \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.5 - Efeito dos EHs das várias espécies de *Phyllanthus* na performance motora (rota-rod)

Os resultados apresentados na tabela 6 demonstram que os EHs das espécies de *Phyllanthus* quando administrados por via oral na dose de 500 mg/kg (5 a 10 vezes maior que a necessária para induzir analgesia), não causaram nenhum efeito no desempenho e nem no tempo de permanência dos animais no aparelho do "rota-rod", quando analisados nos vários intervalos de tempo e comparados com o grupo controle (salina).

Tabela 6 - Efeito dos extratos hidroalcoólicos das várias espécies de *Phyllanthus* em relação à performance motora em camundongos

Tratamento	Dose (mg/kg,	Performance no Rota Rod (s)		
		Tempo após o tratamento (min)		
		15	30	60
Controle	0	57,5 ± 2,7	59,0 ± 2,2	58,5 ± 2,3
<i>P. tenellus</i>	500	59,0 ± 1,4	59,5 ± 1,1	59,5 ± 1,1
<i>P. niruri</i>	500	59,5 ± 1,1	59,5 ± 1,1	59,5 ± 0,9
<i>P. sellowianus</i>	500	56,5 ± 4,5	59,5 ± 1,1	60,0 ± 0,0
<i>P. urinaria</i>	500	58,0 ± 2,2	58,3 ± 2,2	60,0 ± 0,0

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais.

#### 4.6 - Estudo do possível mecanismo de ação antinociceptiva das espécies de *Phyllanthus*

##### 4.6.1 - Efeito do pré-tratamento com a naloxona

Os resultados apresentados na figura 9 demonstram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (5 mg/kg, i.p., antagonista opióide) causou reversão quase completa da analgesia induzida pela administração de morfina (5 mg/kg, s.c., agonista opióide). Contudo, o mesmo tratamento não foi capaz de interferir na ação analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) ou *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) quando analisados em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina.

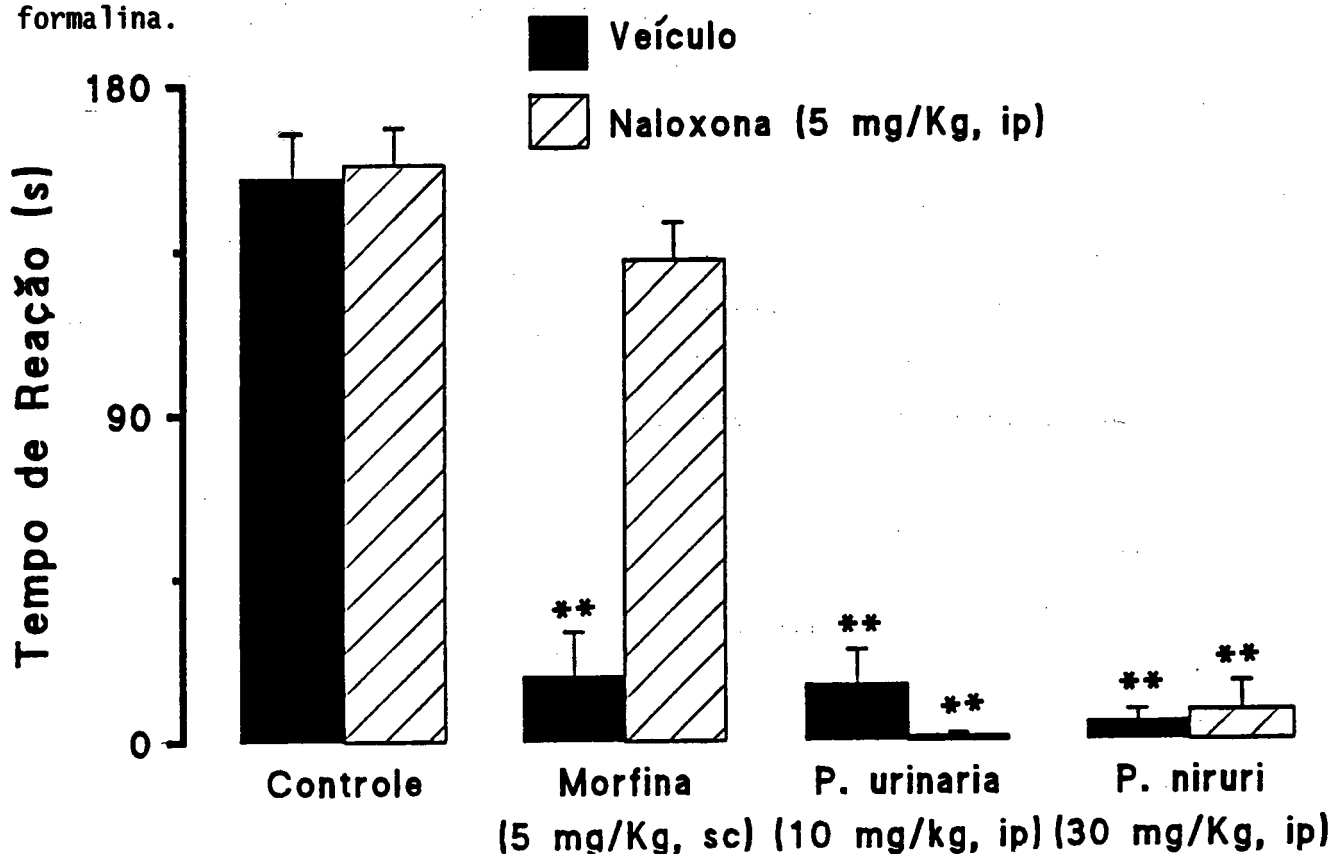


FIGURA 9 - Influência do pré-tratamento de camundongos com naloxona sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* ou da morfina em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.6.2 - Efeito do pré-tratamento com prazosin e ioimbina.

O pré-tratamento dos animais com os antagonistas dos adrenocetores  $\alpha_1$  (prazosin, 0,15 mg/kg, i.p.) e  $\alpha_2$  (ioimbina, 0,15 mg/kg, i.p.) causou completa reversão da atividade analgésica induzida pelos agonistas  $\alpha_1$  (fenilefrina, 10 mg/kg, i.p.) ou  $\alpha_2$  (clonidina, 0,1 mg/kg, i.p.), quando analisados em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Todavia, o mesmo tratamento não interferiu com o efeito analgésico causado pelos EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) ou *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) (figura 10).

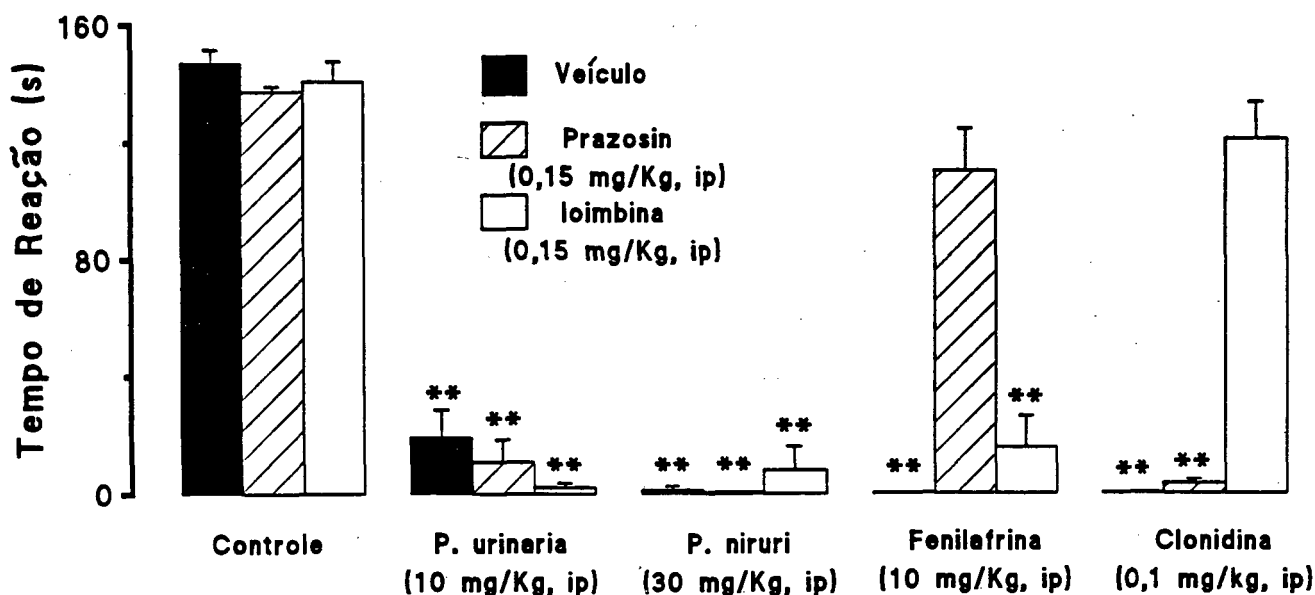


FIGURA 10 - Influência do pré-tratamento de camundongos com antagonistas adrenérgicos,  $\alpha_1$  prazosin e  $\alpha_2$  ioimbina, sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* e pelos agonistas dos adrenocetores  $\alpha_1$  fenilefrina e  $\alpha_2$  clonidina em relação à segunda fase dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle,  $**P < 0,01$ .



#### 4.6.3 - Efeito do pré-tratamento com L-arginina.

Os dados relacionados na figura 11 mostram que o pré-tratamento dos animais com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) reverteu completamente a ação antinociceptiva causada pela administração de L-NOARG (75 mg/kg, i.p.). No entanto, o mesmo tratamento com L-arginina não interferiu com a ação analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) e *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina.

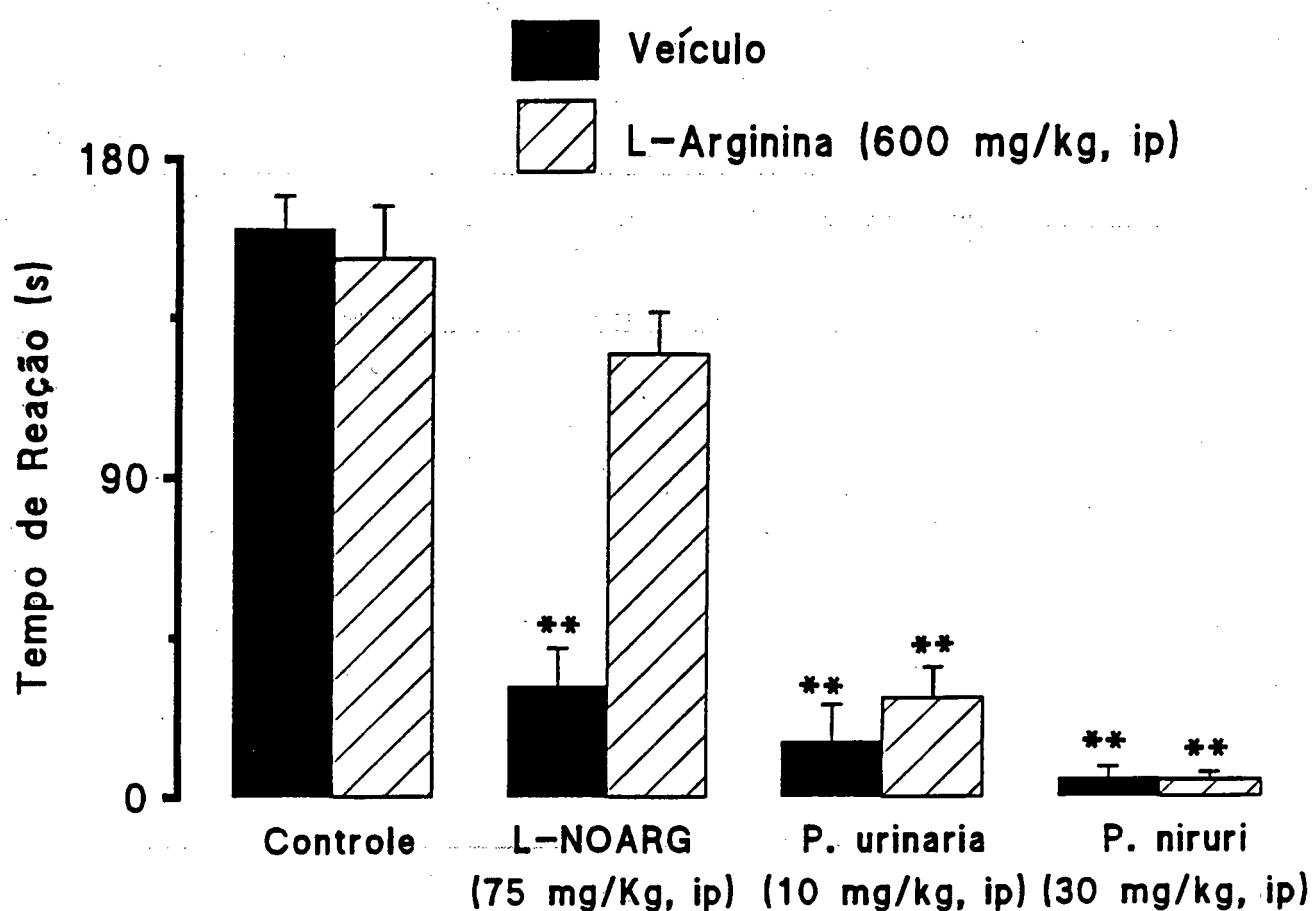


FIGURA 11 - Influência do pré-tratamento com L-arginina sobre a analgesia causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* e pela L-NOARG em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle, \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.6.4 - Efeito do pré-tratamento com PCPA e metisergida

O pré-tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (100 mg/kg, i.p., 1 vez ao dia por 4 dias consecutivos) ou com metisergida (5 mg/kg, i.p.), 30 min antes da administração dos EHs de *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) ou *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.), não alterou significativamente a ação analgésica induzida pelos EHs das espécies de *Phyllanthus* quando comparados com seus respectivos controles em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina (figuras 12 e 13).

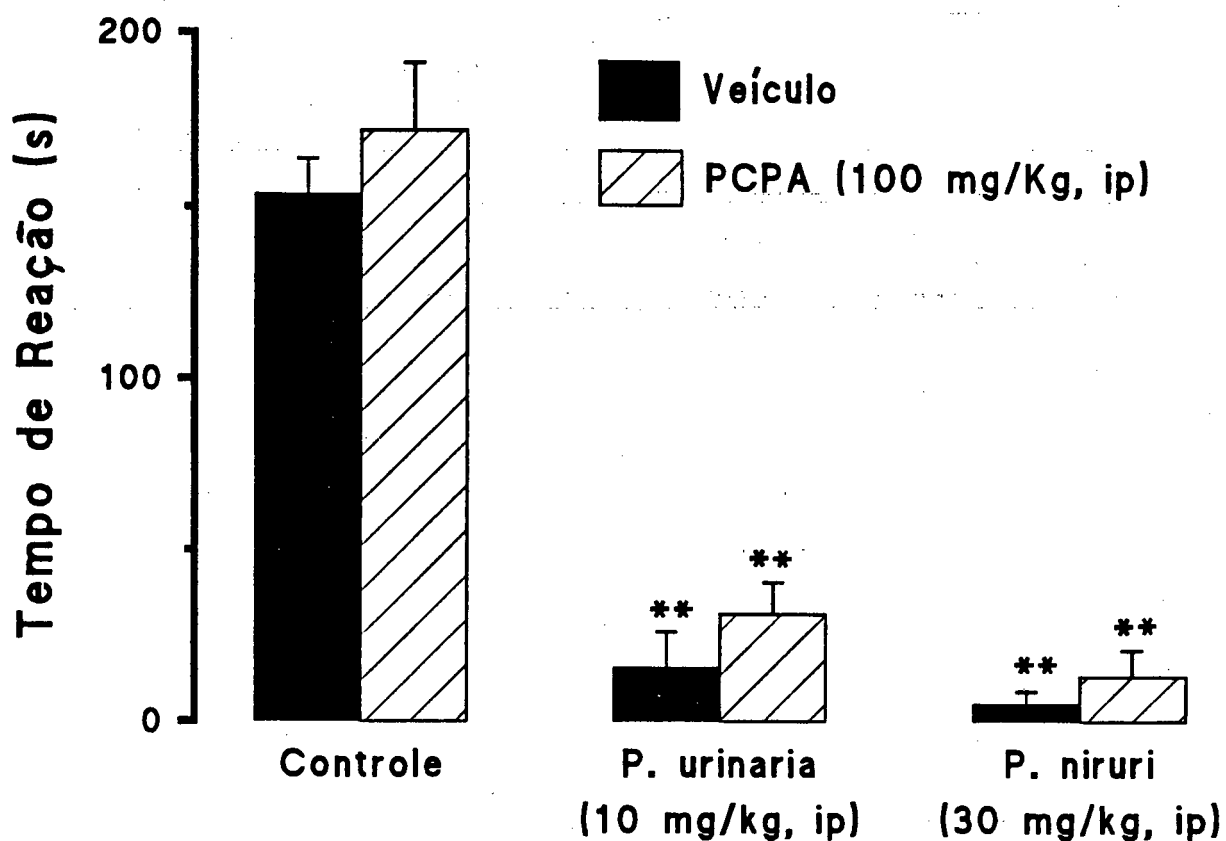


FIGURA 12 - Influência do pré-tratamento por 4 dias com p-clorofenilalanina sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle,  $**p < 0,01$ .

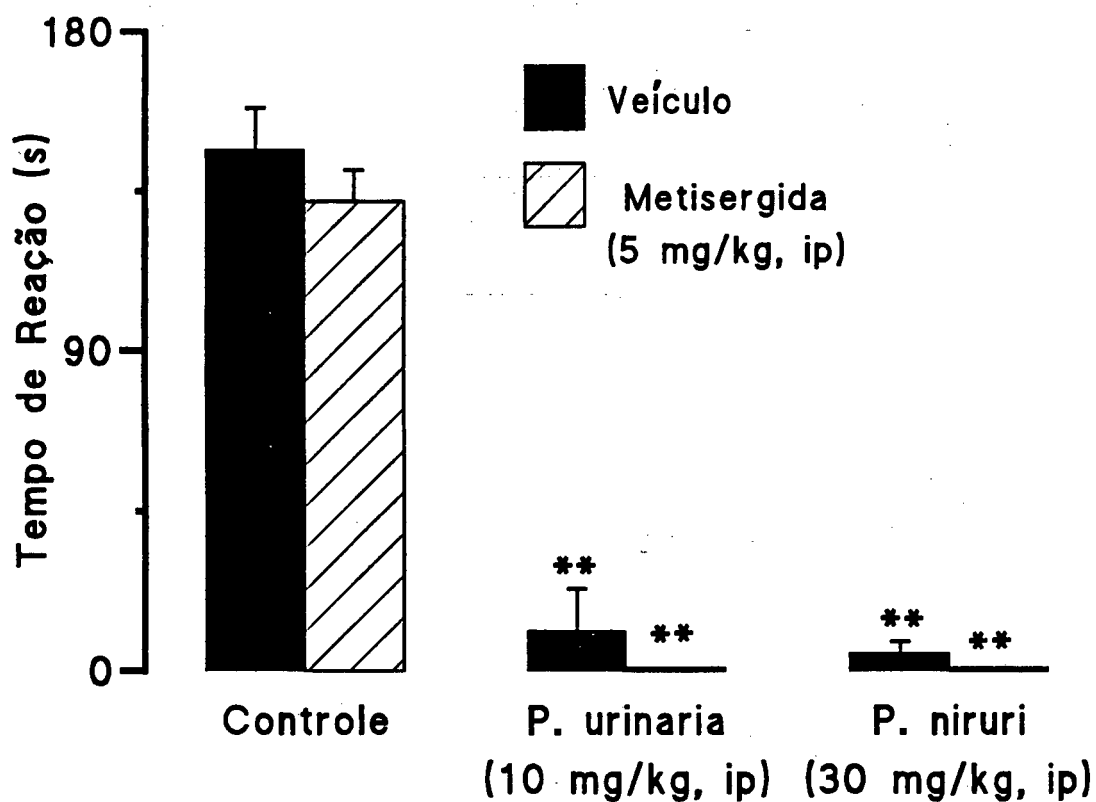


FIGURA 13 - Influência do pré-tratamento com metisergida sobre a atividade analgésica causada pelos EHs do *P. urinaria*, *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle,  $***p < 0,01$ .

#### 4.6.5 - Influência da adrenalectomia

Os resultados sumariados na tabela 7 mostram que os animais adrenalectomizados bilateralmente e, 2 semanas após, tratados com *P. urinaria* (10 mg/kg, i.p.) ou *P. niruri* (30 mg/kg, i.p.) não apresentaram nenhuma alteração da atividade analgésica quando comparados com os animais controles (falso-operados), quando testados em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina.

Tabela 7 - Efeito analgésico dos extratos hidroalcoólicos de *P. urinaria* e *P. niruri* em camundongos controles (falso operados) ou adrenalectomizados (ADX) em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina.

Tratamento	Dose	Tempo de reação (s)	
		ADX	Controle
Salina	-	143.5 ± 9.9	150.7 ± 9.3
<i>P. niruri</i>	30 mg/kg	15.0 ± 12.2	5.2 ± 3.2
<i>P. urinaria</i>	10 mg/kg	16.2 ± 8.0	15.6 ± 10.5

Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 4 - 6 animais.

#### 4.7 - Efeito analgésico dos compostos isolados das várias espécies de *Phyllanthus*

##### 4.7.1 - Dor causada pela injeção de ácido acético.

A exemplo do que foi observado para os EHs das espécies de *Phyllanthus*, o tratamento dos animais com os esteróides, stigmasterol e/ou  $\beta$ -sistosterol (3 - 60 mg/kg, i.p.), 30 min antes, também causou inibição significativa e dose-dependente das contorções abdominais causadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos (tabela 8). As  $DI_{50}$ s (mg/kg) calculadas foram de 16,0

(13,6 - 20,3) e 9,0 (3,5 - 23,2) e IM (%) de  $64 \pm 4$  e  $58 \pm 3$  para o stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, respectivamente. O stigmasterol administrado oralmente também causou significativa inibição das contorções abdominais, porém foi menos potente. A  $DI_{50}$  (mg/kg) estimada foi  $> 200$  e IM (%) de  $23 \pm 7$  (tabela 8). O  $\beta$ -sitosterol não foi testado oralmente devido a pouca quantidade obtida desse composto.

Tabela 8 - Efeito analgésico causado pelo stigmasterol e  $\beta$ -sitosterol administrados por via intraperitoneal ou por via oral sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos.

Tratamento	Número de contorções abdominais			
	Dose (mg/kg)	Intraperitoneal	Dose (mg/kg)	Oral
Stigmasterol	0	$33.4 \pm 0.8$	0	$34.8 \pm 1.0$
	3	$28.2 \pm 1.5^*$	50	$31.0 \pm 2.3^*$
	10	$19.4 \pm 1.1^{**}$	100	$29.0 \pm 2.0^*$
	30	$12.2 \pm 1.3^{**}$	200	$28.0 \pm 2.4^{**}$
	60	$17.8 \pm 1.2^{**}$	-	-
$\beta$ -sitosterol	0	$35.0 \pm 0.7$	-	-
	3	$22.0 \pm 2.3^{**}$	-	-
	10	$16.0 \pm 2.0^{**}$	-	-
	30	$10.0 \pm 1.6^{**}$	-	-
	60	$7.5 \pm 1.1^{**}$	-	-

Cada grupo representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4 - 6 animais.

Difere significativamente em relação ao controle, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

#### 4.7.2 - Dor induzida pela formalina

Os compostos isolados das espécies de *Phyllanthus*, incluindo o stigmasterol e os compostos 1, 2 e 3 administrados intraperitonealmente (1 - 100 mg/kg), 30 min antes, apresentaram significativa inibição dose-dependente de ambas as fases da dor induzida pela formalina e, a exemplo dos EHs, foram mais efetivos em relação à segunda fase desse modelo. As  $DI_{50}$ s (mg/kg) estimadas para primeira fase foram de: aproximadamente > 30, > 30, > 60 e > 60 e IM (%) de  $49 \pm 2$ ,  $41 \pm 2$ ,  $13 \pm 4$  e  $26 \pm 5$  para os compostos 3, 2, 1 e stigmasterol, respectivamente (figuras 14, 15, 16 e 17 A e B). As  $DI_{50}$ s (mg/kg) calculadas para a segunda fase da dor à formalina foram de 4,6 (3,5 - 6,0), 3,5 (2,9 - 4,3), 14,8 (7,3 - 30,0) e 26,4 (21,8 - 32,0) com IM (%) de  $99 \pm 1$ ,  $98 \pm 1$ ,  $87 \pm 8$  e  $88 \pm 4$ , respectivamente para o composto 3, composto 2, composto 1 e stigmasterol (figuras 14, 15, 16 e 17 A e B). Contudo, os compostos isolados dessas espécies de *Phyllanthus* nas mesmas doses que inibiram a dor à formalina, não foram capazes de reduzir significativamente o edema da pata de camundongo associado à segunda fase da dor desse modelo (figuras 14, 15, 16 e 17 C).

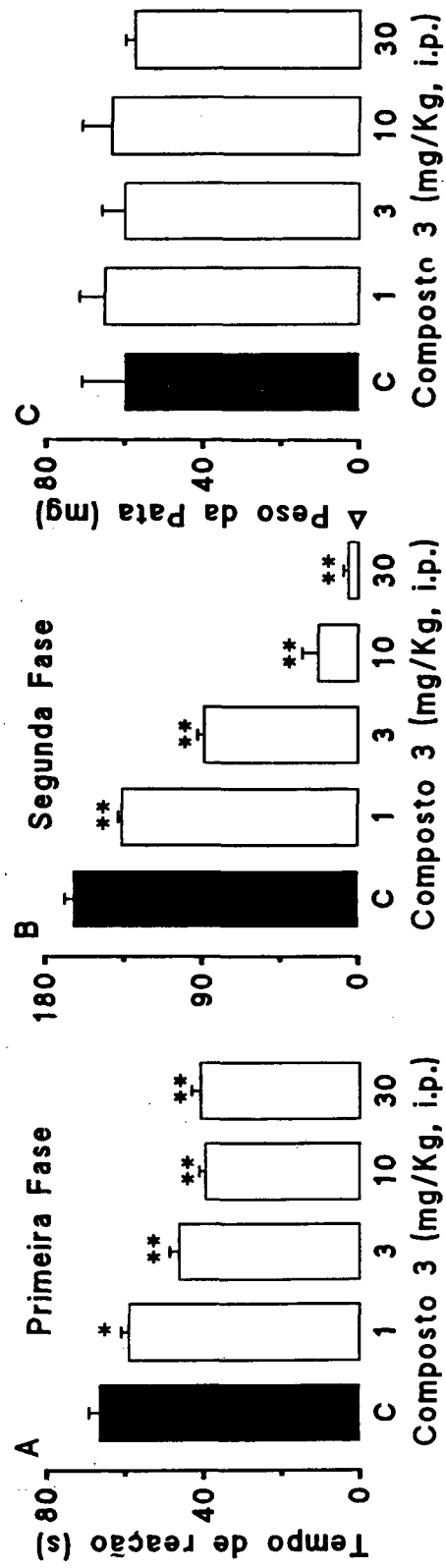


FIGURA 14 - Efeito analgésico causado pelo composto 3 isolado das espécies de *Phyllanthus*, administrado intraperitonealmente em relação à primeira fase (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

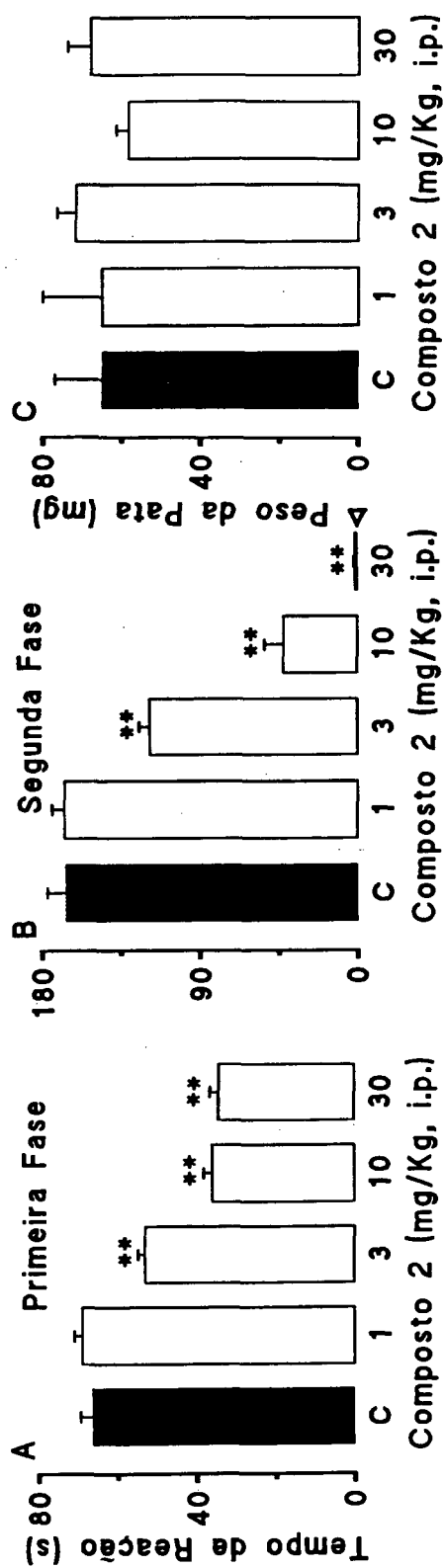


FIGURA 15 - Efeito analgésico causado pelo composto 2 isolado das espécies de *Phyllanthus*, administrado intraperitonealmente em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\* $P < 0,01$ .



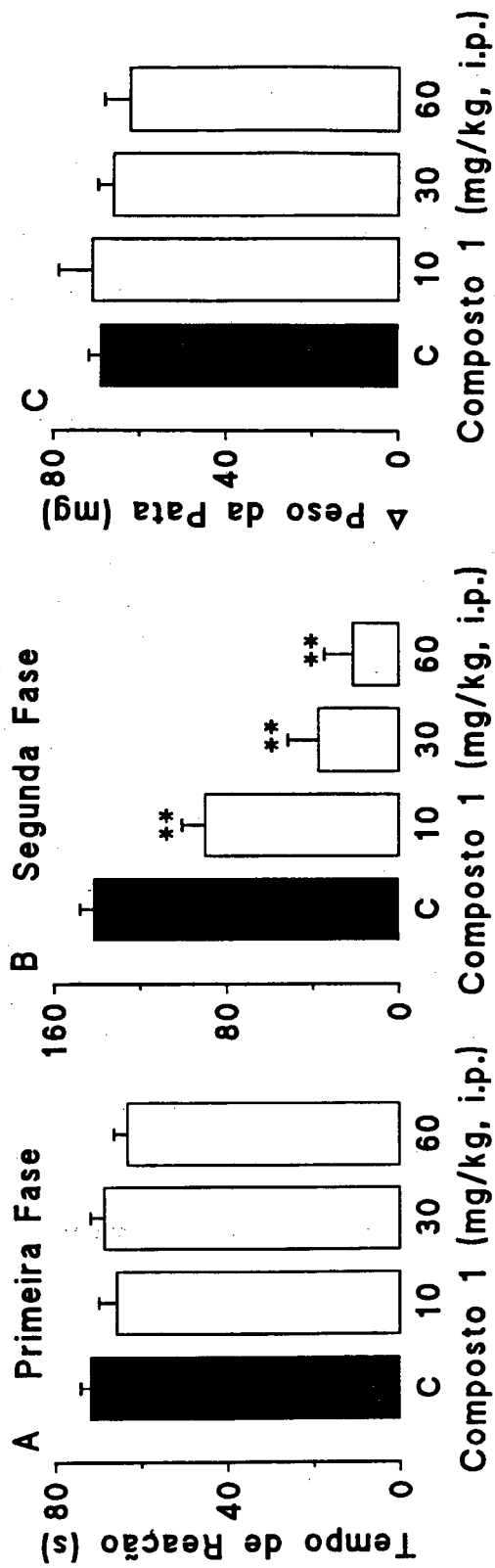


FIGURA 16 - Efeito analgésico causado pelo composto 1 isolado das espécies de *Phyllanthus*, administrado intraperitonealmente em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\* $P < 0,01$ .

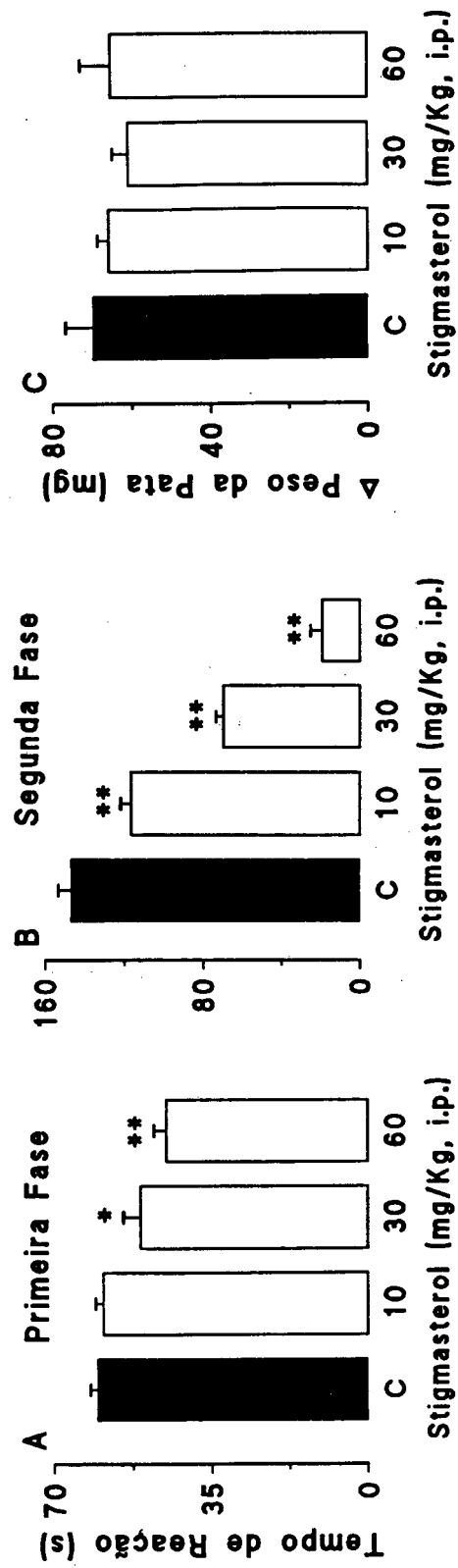


FIGURA 17 - Efeito analgésico causado pelo stigmasterol isolado das espécies de *Phyllanthus* administrado intraperitonealmente em relação à primeira (A), segunda fase (B) da dor e edema de pata (C) induzidos pela formalina em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \*\*P < 0,01.

#### 4.7.3 - Dor induzida pela capsaicina

A figura 18 (C) demonstra que o composto 3 isolado das espécies de *Phyllanthus* (3 - 30 mg/kg, i.p.) causou inibição dose-dependente da dor induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos. A  $DI_{50}$  (mg/kg) calculada foi de 3,3 (2,7 - 4,0) e IM (%) de  $74 \pm 4$ , ao passo que os compostos 1 e 2 administrados intraperitonealmente (3 - 60 mg/kg) causaram inibição parcial da dor induzida pela capsaicina (figura 18 A e B)

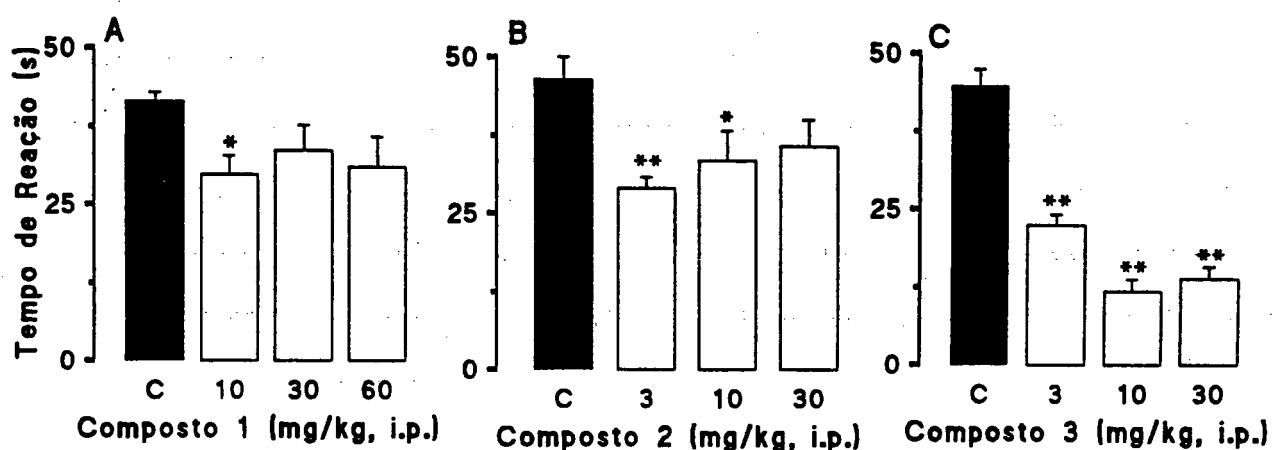


FIGURA 18 - Efeito analgésico causado pelos compostos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) isolados das espécies de *Phyllanthus*, administrados por via intraperitoneal em relação à dor induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais os E.P.M. Difere significativamente do grupo controle (C, barra cheia), \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

## 5 - DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo confirmam e estendem os dados obtidos anteriormente neste laboratório (Gorski et al., 1993) e demonstram que os EHS das diversas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* estudadas apresentaram potente e duradouro efeito analgésico quando analisados em vários modelos de dor em camundongos. A ordem de potência observada de uma maneira geral para as espécies estudadas foi: *P. urinaria* > *P. tenellus* > *P. niruri* > *P. sellowianus*.

Atualmente o interesse por novas substâncias com atividade analgésica, utilizadas principalmente para o controle de vários tipos de dor, inclusive a dor de origem neurogênica relacionada com a liberação de neuropeptídeos pertencentes à família das taquicininas, entre outros, vem aumentando significativamente. Vários modelos de nocicepção, em animais de laboratório, podem ser utilizados para análise da atividade analgésica de diferentes compostos. No entanto, de uma maneira geral eles possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade e validade dos resultados obtidos e, principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos.

As drogas analgésicas podem ser divididas em duas categorias: aquelas que agem em sítios de ação periférica, prevenindo a ativação das terminações nociceptivas ou inibindo a transmissão do impulso aferente, e as que agem em sítios centrais, interferindo diretamente com a transferência da informação nociceptiva ou com a percepção ao estímulo doloroso. Dentre os modelos utilizados neste trabalho destacamos o teste de contorção abdominal, que consiste na injeção intraperitoneal de agentes químicos que irão provocar uma irritação, cujo reflexo é o surgimento de contorções abdominais acompanhadas de extensão de umas das

patas posteriores (para revisão ver Chau, 1989). Vários agentes químicos são geralmente utilizados como irritantes. Entre eles se destacam a fenilbenzoquinona, o zimozan e o ácido acético (para revisão ver Chau, 1989). Whittle (1964) postulou que esses irritantes atuam indiretamente causando liberação de mediadores álgicos endógenos, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas, entre outros, que causariam a estimulação dos neurônios nociceptivos e, conseqüentemente, a indução da dor. Em geral, esse teste é relativamente simples, rápido e sensível a drogas analgésicas e antiinflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outras de ação central (para revisão ver Chau, 1989). No entanto, apesar da falta de especificidade desse modelo, os resultados que ele fornece apresentam boa correlação com a potência exibida por drogas analgésicas em outros modelos pré-clínicos e com aquela encontrada em estudos clínicos (Blane, 1967; Blumberg et al., 1965; Siegmund et al., 1957a, b; Taber et al., 1964).

Os nossos resultados demonstram que os EHs das plantas do gênero *Phyllanthus* estudadas causaram inibição dose-dependente, tanto administrados por via intraperitoneal quanto oral, sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo seus efeitos semelhantes aos observados para a aspirina e o acetoaminofen. A ordem de potência encontrada para os extratos foi: *P. urinaria* > *P. niruri* > *P. tenellus* > *P. sellowianus*. Além disso, os EHs das diversas espécies de *Phyllanthus*, quando administrados por via intraperitoneal, apresentaram rápido início do efeito analgésico (cerca de 30 min) sendo essa ação duradoura (cerca de 4 horas) quando analisada sobre as contorções abdominais induzida pelo ácido acético em camundongos.

Já o teste da formalina, descrito inicialmente em gatos e ratos por Dubuisson e Dennis (1977), consiste na injeção subcutânea de solução de

formaldeído diretamente na pata do animal, sendo conhecido por induzir intensa dor por estimulação das fibras nervosas nociceptivas do tipo alfa e delta. A dor causada pela formalina é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada com o irritante.

A grande maioria dos estudos realizados com esse modelo geralmente utiliza roedores, predominantemente ratos e camundongos (para revisão ver Tjølsen et al., 1992). Ocasionalmente, outras espécies de animais podem ser também utilizadas, incluindo gatos (Auerbach et al., 1985; Melzack e Melinkoff, 1974; Dubuisson e Dennis, 1977; Shima et al., 1987), primatas (Alreja et al., 1984), coelhos (Carli et al., 1981), cobaias (Takahashi et al., 1984), crocodilos (Kanui et al., 1990) e aves (Hughes e Sufka, 1991).

A reação dolorosa causada pela injeção de formalina foi inicialmente observada na pata anterior do animal. No entanto, alguns pesquisadores observaram que a injeção de formalina na pata posterior é mais específica; isso decorre da reação natural de "grooming" do animal, que normalmente ocorre na pata anterior e raramente com a posterior, embora isso deva ser determinado experimentalmente (para revisão ver Tjølsen et al., 1992). Uma característica importante do teste da formalina em roedores é o fato de o animal apresentar duas fases distintas de nocicepção, que parecem envolver dois estímulos distintos (Cowan et al., 1989; Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskaar et al., 1985; Hunskaar e Hole, 1987; Rosland, 1991). A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 min, provavelmente devido à estimulação química direta dos nociceptores (Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskaar et al., 1985), predominantemente das fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A $\delta$  (Heapy et al., 1987). A segunda fase desse modelo ocorre entre 15 - 30 min após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores

pró-inflamatórios (Hunskaar e Hole, 1987).

Resultados experimentais indicam que vários mediadores químicos como a substância P, o glutamato e a bradicinina estão envolvidos com a primeira fase (dor neurogênica), enquanto a histamina, serotonina, prostaglandinas e a bradicinina participam da segunda fase (também chamada dor inflamatória) da dor induzida pela formalina (Corrêa e Calixto, 1993; Hunskaar e Hole, 1987; Shibata et al., 1989).

Coderre et al. (1993) sugeriram que a estimulação nociceptiva prolongada pode produzir uma facilitação do processamento da dor, que persiste além do período da estimulação. Várias condições experimentais, incluindo a transecção (Markus et al., 1984; Wall et al., 1979) e a compressão (Katz et al., 1991; Yamamoto e Yaksh, 1992; Zhuo e Gebhart, 1990) dos nervos aferentes, na artrite reumatóide (Menétry e Besson, 1982; Neugebauer e Schaible, 1990), ou após injeção subcutânea de vários irritantes como a capsaicina e a carragenina (Iadorola et al., 1988; Lamotte et al., 1991), podem causar a facilitação do reflexo doloroso ou da resposta eletrofisiológica à estimulação nociceptiva. Um fenômeno idêntico ocorre após a estimulação elétrica direta das fibras aferentes do tipo C. No entanto, a estimulação repetida das fibras C produz uma resposta exagerada dos neurônios dorsais medulares (Schouenbourg e Dickenson, 1985), fenômeno esse denominado de "hiperalgesia" (Dickenson, 1990).

Considerável esforço tem sido realizado para o entendimento dos mecanismos responsáveis pela hiperalgesia, uma vez que essa representa o exemplo importante de modulação da reação dolorosa. Por outro lado, os receptores dos neurotransmissores algícos periféricos são conhecidos por sensibilizarem o local lesado a estímulos nociceptivos, ou por induzirem potencialização da estimulação dolorosa (Beitel e Dubner, 1976). Contudo, essa hiperalgesia frequentemente se

estende não só próximo ao local lesionado, mas também a outras regiões distantes da lesão (Coderre e Melzack, 1985; Woolf, 1984). Tais observações sugerem que o mecanismo de sensibilização dolorosa envolve, ainda, a participação importante do sistema nervoso central (Hardy et al., 1950).

Acredita-se que diversos transmissores químicos, entre eles os aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato) e a substância P, apresentam papel relevante no processo de sensibilização do corno dorsal da medula espinhal, uma vez que a estimulação das fibras aferentes primárias induz a liberação de aminoácidos excitatórios e substância P no corno dorsal da medula (Go e Yaksh, 1987; Skilling et al., 1988; Sorkin et al., 1992). Além disso, a substância P e os aminoácidos excitatórios encontram-se co-localizados nas fibras aferentes nociceptivas (Battaglia e Rustioni, 1988; Debiasi e Rustioni, 1988). A administração espinhal de antagonistas da substância P (agonista de receptor  $NK_1$ ) e/ou de glutamato (agonista de receptores AMPA e/ou NMDA) são capazes de bloquear a facilitação do processo nociceptivo produzido pela estimulação direta ou prolongada das fibras C (Coderre e Melzack, 1991; Dickenson e Sullivan, 1987 a, b; MalMBERG e Yaksh, 1992a; Mao et al., 1992; Ren et al., 1992; Woolf e Thompson, 1991; Yamamoto e Yaksh, 1992).

A injeção intratecal de antagonista de receptores de NMDA, AMPA ou de receptores  $NK_1$  antes da injeção de formalina, foi capaz de inibir parcialmente a primeira, mas reduziu marcadamente a segunda fase da dor causada pela formalina (Coderre e Melzack, 1992 a, b; Haley et al., 1990; MalMBERG e Yaksh, 1992a; Yamamoto e Yaksh, 1992). No entanto, a administração desses antagonistas 5 min após a injeção da formalina não determinou inibição da segunda fase desse modelo (MalMBERG e Yaksh, 1992a). Ao contrário, os inibidores da síntese de prostaglandinas e de óxido nítrico causaram significativa inibição da segunda



fase da dor induzida pela formalina, sem interferir, no entanto, com a primeira fase (Malmberg e Yaksh, 1992b; Malmberg e Yaksh, 1993). O fenômeno de sensibilização dos neurônios espinhais parece ser consequência da liberação de prostaglandinas e de óxido nítrico, resultando na sensibilização central e na manifestação da hiperalgisia na segunda fase da dor induzida pela formalina. Já a injeção de agonistas seletivos dos receptores de NMDA e AMPA e/ou de substância P na medula espinhal produz hiperalgisia quando analisada nos modelos que utilizam o estímulo térmico agudo (Malmberg e Yaksh, 1992a; Meller et al., 1992).

Recentemente, foi demonstrado através de microdiálise no espaço subaracnóide medular, utilizando cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), que a injeção intraplantar de formalina na pata posterior de ratos conscientes, causou significativo aumento de vários aminoácidos excitatórios, entre eles, glutamato, aspartato, taurina, glicina, citrulina, além de aumentar os níveis de prostaglandina  $E_2$ , mas não alterou os níveis de serina, asparagina e glutamina em relação à primeira fase da dor induzida pela formalina. Na segunda fase, observou-se apenas o aumento da citrulina, prostaglandina  $E_2$ , glutamato e aspartato (Malmberg e Yaksh, 1995).

Os nossos resultados demonstram que os EHs das várias espécies de *Phyllanthus* estudadas apresentaram potente efeito analgésico em ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo mais efetivos em relação à segunda fase. Contudo, esses extratos, quando administrados em doses acima daquelas necessárias para causar analgesia não interferiram com a formação do edema de pata associado com a segunda fase desse modelo. Não foram capazes, também, de inibir por completo a primeira fase da nocicepção do teste da formalina, também chamada dor de origem neurogênica, conhecido por estimular diretamente os neurônios nociceptivos. Esses resultados sugerem, portanto, que parte da resposta

nociceptiva da primeira fase do teste da formalina envolve mediadores que são insensíveis aos princípios ativos contidos nos EHs das diversas espécies de *Phyllanthus*.

Os compostos 1, 2 e 3 (ainda não identificados) isolados dessas espécies de *Phyllanthus* apresentaram perfil de ação analgésica semelhante aos EHs, sendo efetivos em inibir ambas as fases da dor à formalina. Além disso, da mesma forma que foi observado para os EHs, eles foram mais efetivos em inibir a segunda fase desse modelo. Nossos resultados demonstram também que alguns fitoesteróides isolados do *P. corcovadensis*, incluindo o stigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol, causaram inibição dose-dependente da dor causada pelo ácido acético, bem como da dor causada pela formalina em camundongos, sugerindo que esses esteróides poderiam estar também colaborando de alguma maneira com as ações antinociceptivas dos EHs do *P. corcovadensis* (Gorski et al., 1993). Em outras palavras, esses compostos poderiam estar agindo sinergicamente com outros compostos presentes nesse extrato. Contudo, o EH do *P. corcovadensis*, bem como os EHs do *P. urinaria* e *P. niruri*, não causaram inibição da formação do edema de pata de rato induzido pela carragenina, enquanto a indometacina causou significativa inibição do edema (resultado não apresentados). No entanto, a segunda fase (também chamada de dor inflamatória) da nocicepção induzida pela formalina foi abolida quase que completamente por drogas que inibem a atividade da ciclooxigenase e conseqüentemente, a formação de prostaglandinas (Abbott e Franklin, 1986; Chapman e Dickenson, 1992; Corrêa e Calixto, 1993; Hunskaar et al., 1985; ; Murray et al., 1988). Os nossos resultados confirmam essas observações e demonstram que a indometacina, aspirina e acetoaminofen, conhecidos inibidores da ciclooxigenase, e por conseguinte da síntese dos prostanóides, reduziram de forma significativa somente a segunda fase da dor induzida pela formalina, confirmando, assim, os

resultados obtidos anteriormente (Abbott e Franklin, 1986; Corrêa e Calixto, 1993; Hunskaar et al., 1985).

Estudos descritos na literatura demonstraram que os sistemas serotoninérgico e adrenérgico estão envolvidos no mecanismo da regulação da transmissão da informação nociceptiva no sistema nervoso central (Basbaum e Fields, 1984; Fields et al., 1991; Lipp, 1991; Yaksh, 1985). Assim, um grande número de drogas vem sendo utilizado para o tratamento de dores crônicas, destacando-se principalmente os antidepressivos tricíclicos (Walsh, 1983; Ventafridda et al., 1990; Magni, 1991). Vários estudos sugerem que esse efeito pode estar relacionado com a melhora do humor (Almay et al., 1987; Magni, 1987; Ward et al., 1979), enquanto outros autores sugerem que eles produzem analgesia por mecanismos mais específicos (Ansuategui et al., 1989; Panerai et al., 1991). No entanto, os antidepressivos tricíclicos são tradicionalmente conhecidos por estimular a atividade da serotonina e noradrenalina pelo bloqueio da recaptção neuronal (Carlsson et al., 1969 a, b). Além disso, eles não agem especificamente nos neurônios monoaminérgicos, mas também em outros sistemas neuroquímicos justificando, portanto, a manifestação da resposta analgésica em paciente não-deprimidos (Leijon e Boivie, 1989; Sharav et al., 1987).

Os antidepressivos tricíclicos induzem significativa ação analgésica em animais (Ansuategui et al., 1989; Ardid et al., 1991; Fialip et al., 1992), por interação com o sistema opióide endógeno, uma vez que essas drogas potencializam a resposta analgésica induzida por drogas opióides (De Felipe et al., 1986; Malseed e Goldstein, 1979; Taiwo et al., 1985). Biegon e Samuel (1980) demonstraram que os antidepressivos tricíclicos deslocaram o binding de [<sup>3</sup>H]-naloxona em preparação de membranas cerebrais de rato, sugerindo a interação com os receptores opióides.

Vários estudos têm demonstrado que o tratamento dos animais com p-clorofenilalanina (PCPA), inibidor da síntese de serotonina, foi capaz de antagonizar parte do efeito analgésico mediado pela morfina (Taber e Latranyi, 1981; Von Voigtländer et al., 1984), indicando que esses efeitos analgésicos parecem estar relacionados, pelo menos em parte, à interação com os neurônios serotoninérgicos centrais que estão envolvidos na modulação da transmissão da dor. No entanto, o tratamento dos animais com PCPA ou com o antagonista serotoninérgico não seletivo, metisergida, não causou alteração da ação analgésica induzida pelas espécies de *Phyllanthus* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Tais resultados sugerem que a ação analgésica dessas plantas independe da interação com o sistema serotoninérgico.

Por outro lado, vários trabalhos demonstram que os agonistas seletivos dos  $\alpha$ -adrenoceptores, incluindo a fenilefrina e a clonidina, quando injetados sistemicamente, induziram pronunciada ação analgésica em vários modelos de nocicepção (Butelman e Woods, 1992; Kayser et al., 1992; Tasker et al., 1992; Uhlén et al., 1990), sendo esse efeito seletivamente antagonizado pela administração de antagonistas seletivos dos adrenoceptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ . Nossos resultados confirmam essas observações e demonstram que o tratamento sistêmico dos animais com os antagonistas dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos, prazosin e ioimbina, em condições em que eles reverteram completamente o efeito antinociceptivo causado pela fenilefrina ou pela clonidina, respectivamente, não alteram significativamente o efeito analgésico causado pelos extratos do *P. urinaria* e *P. niruri* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Esses resultados indicam, portanto, que os receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos não parecem estar envolvidos no efeito analgésico dos extratos das espécies de *Phyllanthus* estudadas.

Recentemente, vários estudos sugerem o envolvimento da via do óxido nítrico-L-arginina na modulação da nocicepção (Haley et al., 1992; Snyder, 1992; Yaksh e Rudy, 1977). Moore et al. (1991) demonstraram que a L-N<sup>6</sup>-nitro-arginina metil éster (inibidor da óxido nítrico sintase), administrada sistêmica ou centralmente, causou importante efeito analgésico em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, além de causar a inibição da hiperalgesia induzida por agonistas de receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) (Kitto et al., 1992), deprimindo também a facilitação do reflexo nociceptivo (Verge et al., 1992), ou reduzindo a resposta em neurônios dorsais da medula após estimulação mecânica e térmica (Coderre e Yashpal, 1994; Moore et al., 1991; Yaksh e Rudy, 1977; Yamamoto et al., 1993). Os resultados obtidos no presente estudo confirmam essas observações e demonstram que a administração sistêmica de L-N<sup>6</sup>-nitro arginina (L-NOARG, inibidor da síntese de óxido nítrico) inibiu de maneira pronunciada a segunda fase da dor causada pela formalina, sendo esse efeito seletivamente revertido pela injeção de L-arginina (precursor do óxido nítrico). Contudo, o mesmo tratamento com a L-arginina não foi capaz de reverter o efeito analgésico causado pelos extratos do *P. urinaria* e *P. niruri*. Esses resultados demonstram, portanto, que a via do óxido nítrico-L-arginina não parece estar envolvida com a ação antinociceptiva dos princípios ativos presentes nos extratos das plantas do gênero *Phyllanthus*.

Kawabata et al. (1993) demonstraram que a administração intracerebro-ventricular de L-arginina (precursor do óxido nítrico) ou de L-N<sup>6</sup>-nitro-arginina metil éster (L-NAME) induziu potente efeito analgésico quando analisada na dor causada por irradiação de um feixe luminoso no modelo de tail-flick em camundongos. Além disso, essa ação analgésica da L-arginina foi revertida pelo tratamento dos animais com antagonista opióide (naltrindole,  $\delta$  seletivo) ou pela

L-leucil-L-arginina (Leu-arg), antagonista da kiotorfina (liberador endógeno da met-enkefalina). No entanto, a administração intracerebroventricular de azul de metileno (inibidor da guanilato monofosfato cíclica solúvel) causou potente efeito antinociceptivo, efeito esse revertido pela administração de dibutiril guanilato monofosfato cíclico (ativador da guanilato ciclase). Tais resultados indicam que a via do óxido nítrico apresenta um papel duplo no controle da nocicepção central, sendo que a L-arginina pode apresentar tanto efeito antinociceptivo mediado pela formação da kiotorfina (Ueda et al., 1987; Takagi et al., 1979 a, b), como pode causar hiperalgesia através da ativação da guanilato ciclase (Duarte et al., 1990; 1992; Ferreira et al., 1992; Meller et al., 1992; Morris et al., 1992).

Nossos resultados indicam também que os EHs das espécies de *Phyllanthus* estudadas, em doses de 5 a 10 vezes maiores que as necessárias para induzir analgesia em modelos de dor de origem neurogênica e/ou inflamatória, não apresentaram nenhum efeito analgésico quando analisados em relação a dois modelos clássicos de nocicepção; o tail-flick, descrito inicialmente por D'Amour e Smith (1941) e a placa-quente, descrita por Woolfe e MacDonald (1944) e posteriormente modificada por Eddy e Leimback (1953). Esses dois modelos são geralmente utilizados para a análise de drogas analgésicas semelhantes à morfina, sendo também sensível a outras drogas que atuam no sistema nervoso central (Carter, 1991; Hwang e Wilcox, 1987; Kameyama et al., 1985; O'Callaghan e Holtzman, 1975; Woolfe e MacDonald, 1944; Zimer et al., 1986). No entanto, nas mesmas condições experimentais nas quais a morfina (agonista opióide) apresentou potente e significativo efeito analgésico, no modelo do tail-flick e na placa quente, os EHs das espécies de *Phyllanthus* foram destituídos de efeito analgésico, indicando que suas ações analgésicas não estão relacionadas com o sistema opióide.

O controle da transmissão nociceptiva bem como da ação analgésica das drogas semelhantes à morfina, que atuam nos vários tipos de receptores opióides ( $\mu$ , kappa, delta) distribuídos tanto periférica quanto centralmente têm sido bem estabelecidos (para revisão ver Besson e Chaouch, 1987). As drogas do grupo da morfina também causam marcada inibição em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina (Corrêa e Calixto, 1993; Gorski et al., 1993; Hunskaar et al., 1985; Murray et al., 1988; Shibata et al., 1989). Esses resultados foram confirmados pelo uso da naloxona, antagonista de receptor opióide não seletivo, que foi capaz de reverter completamente a analgesia induzida pela morfina sem afetar, contudo, o efeito analgésico causado pelas espécies de *Phyllanthus* em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina. Além disso, a adrenalectomia bilateral prévia dos animais não influenciou o efeito analgésico induzido pelos EHs das espécies de *Phyllanthus*, sugerindo assim que seus efeitos antinociceptivos independem da liberação de glicocorticóides endógenos.

Sakurada et al. (1992) demonstraram que a injeção intraplantar de capsaicina na pata posterior de camundongos, causou vigorosa dor, caracterizada por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com a dor de origem neurogênica. A capsaicina é um produto extraído da pimenta vermelha que, quando aplicada na pele ou injetada em ratos, induz irritação caracterizada por reação dolorosa e subsequente dessensibilização para a dor induzida quimicamente (Jancsó et al., 1981). Além disso, a capsaicina pode liberar neuropeptídeos como a substância P imunorreativa em neurônios aferentes primários centrais (Gamse et al., 1979). Estudos *in vitro* mostram que a capsaicina despolariza os neurônios sensoriais tipo C do gânglio da raiz dorsal medular e induz a liberação de neuropeptídeos, incluindo substância P, neurocinina A, neurocinina B, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e

somatostatina, entre outros. Já quando administrada *in vivo*, a capsaicina libera substância P no corno medular de gato e produz dessensibilização dos neurônios primários aferentes quando administrada agudamente (Gamse et al., 1981; Lembeck, 1988; Szolcsányi, 1985).

Os neuropeptídeos liberados, pela capsaicina, de neurônios primários aferentes, estão envolvidos na transmissão de diferentes informações nociceptivas. Quando liberadas, a substância P, a neurocinina A e a neurocinina B podem estimular três diferentes subtipos de receptores taquicinérgicos, conhecidos como NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> e NK<sub>3</sub>, respectivamente (Lavielle et al., 1988; Maggi et al., 1987, Quirion e Dam, 1988). Piercey et al. (1981) demonstraram que a resposta nociceptiva induzida pela injeção subcutânea de capsaicina foi deprimida pela administração de [D-Pro<sup>2</sup>, D-Phe<sup>7</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>] SP, antagonista seletivo da substância P. Sakurada et al. (1992, 1993) demonstraram que o modelo de dor neurogênica induzida pela capsaicina pode ser adequado para o estudo de drogas que possam atuar como antagonistas dos receptores taquicinérgicos.

Os EHs de *P. urinaria* e *P. niruri*, bem como o composto 3 isolado das espécies de *Phyllanthus*, causaram potente efeito analgésico nesse modelo. Fato interessante é que as drogas que não apresentaram efeito analgésico na primeira fase da dor induzida pela formalina foram quase completamente destituídas de efeito analgésico no teste da capsaicina. Por exemplo, a indometacina, que não inibiu a primeira fase mas reduziu significativamente a segunda fase da dor induzida pela formalina, não inibiu a dor induzida pela capsaicina, enquanto a dipirona causou inibição da dor nesse modelo, embora tenha sido cerca de 25 e 9 vezes menos potente que o extrato de *P. urinaria* e *P. niruri*, respectivamente. Já a morfina inibiu com a mesma potência a dor induzida pela formalina e pela capsaicina. Por outro lado, os compostos 1 e 2 isolados das espécies de *Phyllanthus* foram destituídos de efeito analgésico quando analisados no teste da



capsaicina, sugerindo que os EHs das espécies de *Phyllanthus* apresentam diferentes compostos que podem estar atuando por mecanismos distintos em determinados tipos de dor. Esses resultados sugerem, portanto, que os efeitos analgésicos dos princípios ativos presentes nessas plantas podem resultar, pelo menos em parte, da interação com o sistema taquicinérgico.

Recentemente, trabalhos de nosso grupo demonstraram que o extrato de *P. urinaria* causou contração concentração-dependente na bexiga e na traquéia isoladas de cobaia. O efeito contrátil induzido pelo EH de *P. urinaria* na traquéia, mas não na bexiga, foi bloqueado por antagonistas seletivos de receptores NK<sub>1</sub> (FK 888) ou NK<sub>2</sub> (SR 48968) taquicinérgicos ou pelo vermelho de rutênio, um antagonista seletivo de canal de cálcio acoplado ao receptor vanilóide ativado por capsaicina (Amann e Maggi, 1991). Além disso, a contração da bexiga e/ou da traquéia de cobaia foi inibida na presença de solução sem Ca<sup>2+</sup>, mas não por nicardipina (bloqueadora de canal de cálcio tipo L), w-conotoxina (bloqueadora de canal de cálcio tipo N) ou tetrodotoxina (bloqueadora neuronal) (resultados não apresentados).

Estudos pré-clínicos e clínicos realizados com diversas espécies de plantas do gênero *Phyllanthus* demonstraram que essas plantas são efetivas contra um grande número de patologias, confirmando assim seus vastos usos na medicina tradicional para o tratamento do cálculo renal e urinário, diabetes, disenteria e outras infecções intestinais (Morton, 1981; Oliver-Bever, 1983; Calixto et al., 1984; Shimizu et al., 1989; Santos, 1990; Obasi et al., 1993; Davery et al., 1994). Elmeckawy et al. (1995) demonstraram que o extrato de 41 plantas utilizadas na medicina popular egípcia foram efetivos em inibir a enzima transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência (HIV-1) humana. Entre essas plantas destaca-se o extrato metanólico obtido das frutas do *P. emblica*, que

apresentou significativa ação inibitória da transcriptase reversa daquele vírus. Recentemente, Polya et al. (1995), demonstraram que alguns taninos hidrolisáveis isolados do *P. amarus* causaram potente inibição de várias proteínas quinase, entre elas a proteína quinase dependente de AMPc no fígado de rato, proteína quinase dependente de cálcio em embrião de trigo, proteína quinase C e proteína quinase dependente de calmodulina no cérebro de rato, sendo que os taninos inibiram com mais especificidade a proteína quinase dependente de AMPc, entre eles, ésteres derivados do ácido gálico e o ácido gálico.

Além disso, foi demonstrado recentemente que os extratos aquosos de algumas espécies de *Phyllanthus* causaram inibição, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, da replicação do vírus da hepatite B (Venkateswaran et al., 1987; Thyagarajan et al., 1988; Blumberg et al., 1989; Shead et al., 1992; Yeh et al., 1993), além de apresentar ação antineoplásica (Kupchan et al., 1978; Pettit et al., 1983, 1984, 1985, 1990; Dhir et al., 1990).

Unander (1991) demonstrou que os extratos aquosos de *P. amarus*, *P. abnormis* e *P. urinaria* obtidos através de cultura de tecido *in vitro* em meio contendo ácido 2,4-diclorofenoxiacético ou ácido indole-butírico, mas não com o ácido indole-acético, apresentaram princípios ativos que causaram inibição *in vitro*, tanto da DNA-polimerase do vírus da hepatite B quanto da transcriptase reversa, sugerindo que os compostos obtidos por cultivo *in vitro* presentes nas espécies de *Phyllanthus* são efetivos para o tratamento desse vírus (Unander, 1991). Recentemente, Ishimaru et al. (1992) demonstraram que o extrato obtido a partir de cultura de tecido do *P. niruri* apresentou vários constituintes fenólicos, incluindo o ácido gálico, (-)-epicatechin, (+)-gallacatechin, (-)-epigallocatechin, (-)-epicatechin 3-O-gallate e (-)-epigallocatechin 3-O-gallate. Nossos resultados demonstram que os extratos metanólicos obtidos do *P.*

*corcovadensis*, *P. niruri* e *P. tenellus* através de cultura de tecido *in vitro*, utilizando o meio ácido 2,4-diclorofenoxiacético, ácido indol-butírico ou com o ácido indol-acético, mostraram atividade antinociceptiva quando analisados em dois modelos de nocicepção: o teste de contorções abdominais causadas pelo ácido acético e contra ambas as fases da dor induzida pela formalina em camundongos (Santos et al., 1994). No entanto, a ação analgésica dos extratos de *Phyllanthus* obtidos através desse método foi menor quando comparada com o efeito analgésico causado pelos extratos hidroalcoólicos obtidos diretamente das espécies de *P. corcovadensis* (Gorski et al., 1993), *P. niruri* e *P. tenellus* (presente estudo).

A análise fitoquímica preliminar dos extratos metanólicos dos callus revelou que esses não continham alcalóides ou flavonóides. Entretanto, a análise por HPLC revelou a presença de 7 compostos para o *P. tenellus*, 3 para o *P. corcovadensis* e 5 para o *P. niruri*. No entanto, em função da pouca quantidade de material disponível, não foi possível identificar esses compostos. A análise por infravermelho e  $H^1$ -NMR sugeriu apenas que o extrato de callus de *P. tenellus* contém açúcar, e também revelou a presença de compostos fenólicos (Santos et al., 1994). Assim, não pode também ser totalmente descartada a possibilidade de que os princípios ativos efetivos no tratamento da hepatite B, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, possam ser também responsáveis pelas ações analgésicas já que esses princípios podem desenvolver no mesmo meio de cultura *in vitro*. Contudo, essa hipótese precisa ser investigada.

Em síntese, os resultados do presente estudo, juntamente com os descritos recentemente por Gorski et al. (1993), indicam que os princípios ativos presentes nos EHs das espécies de *Phyllanthus* estudadas apresentam potente e duradouro efeito analgésico em vários modelos de nocicepção em camundongos. Suas ações antinociceptivas não parecem estar relacionadas com a ativação do sistema

opióide, inibição da síntese de prostaglandinas, interação com os glicocorticóides endógenos, com os receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos ou serotoninérgicos ou com a síntese de serotonina. Além disso, seus efeitos analgésicos não parecem estar envolvidos com a via do óxido nítrico-L-arginina ou com a depressão do sistema nervoso central ou periférico. Contudo, o fato de os EHs e princípios ativos das plantas do gênero *Phyllanthus* serem efetivos, como analgésicos, nos modelos de dor neurogênica induzida pela capsaicina e formalina em camundongos, sugere fortemente um mecanismo de ação relacionado com a interação com os neuropeptídeos álgicos, principalmente as taquicininas. A possibilidade desses princípios ativos estarem também interagindo com os aminoácidos excitatórios do tipo glutamato e aspartato não pode ser também descartada. Essas hipóteses, porém, precisam ser melhor investigadas experimentalmente.

Esses resultados abrem, portanto, novas perspectivas para o uso das plantas do gênero *Phyllanthus* no tratamento da dor, em especial a dor de origem neurogênica, e podem também contribuir para explicar seus efeitos benéficos já confirmados no tratamento das afecções renais e/ou biliares.

## SUMMARY

1 - This study examines the analgesic effects of the hydroalcoholic extracts (HE) of some active principles obtained from leaves, stems and roots of plants belonging to the genus *Phyllanthus*. We tested compounds and extracts from *P. urinaria*, *P. tenellus*, *P. niruri* and *P. sellowianus* in several models of nociception in mice.

2 - The HEs of the various *Phyllanthus* species, given either by i.p. or oral routes, produced dose-related antinociceptive activities against acetic acid-induced abdominal constriction. Their potencies were similar to that shown by aspirin and acetoaminophen. The relative rank order of potency was: *P. urinaria* > *P. tenellus* > *P. niruri* > *P. sellowianus*. All HEs exhibited similar analgesic effects against the first (neurogenic pain) phase of formalin-induced pain, but were more active against the second (inflammatory) phase of this pain model. In sharp contrast, indomethacin, aspirin and acetoaminophen inhibited only the second phase of formalin-induced pain. In addition, indomethacin, but not the HEs of *Phyllanthus*, caused significant inhibition of the oedematogenic response associated with the later phase of formalin test.

3 - The HE of *P. urinaria* and *P. niruri*, given either i.p. or oral routes, caused marked and dose-related inhibition of capsaicin-induced neurogenic pain in mice. Dipyrrone and morphine, but not indomethacin also caused marked analgesic effects against capsaicin-induced pain. These results suggest that the antinociceptive action of the active principles presents in *Phyllanthus* plants, might result, at least in part, from their interactions with the tachykinin system, known to be involved in the genesis of neurogenic pain. In addition, since HEs of *P. urinaria*

and *P. niruri* failed to affect carrageenan-induced rat paw oedema, even when given orally at high doses, their analgesic effects appear to be unrelated to inhibition of prostaglandin synthesis.

4 - The HEs of various *Phyllanthus* species were virtually inactive in the tail-flick and hot-plate tests, where morphine caused marked analgesic effect in both tests. In addition, the HEs did not cause any significant effect on motor coordination, as evaluated by performance on a rota-rod. These findings strongly suggest that the analgesic effects of the active principles, present in HEs are specific and are not the results of either peripheral or central depressor action.

5 - The antinociceptive effects of *P. urinaria* and *P. niruri* HEs, when analysed against the second phase of the formalin model were unaffected by pre-treatment with antagonists against opioid (naloxone),  $\alpha$ -adrenergic (prazosin and yohimbine) or serotonergic receptors (methysergide), or with a precursor of nitric oxide (L-arginine). In contrast, the same treatment of animals with these drugs completely antagonized the antinociceptive effects caused by their respective agonists.

6 - Adrenalectomy, 15 days before testing, did not cause any significant inhibition of the antinociceptive effects of *P. urinaria* and *P. niruri* HEs against the second phase of formalin-induced pain.

7 - Chemical analysis of the HEs of plants of the *Phyllanthus* genus revealed that these plants contain several classes of compounds, including alkaloids, flavonoids, steroids and phenols. Some of these compounds, given by i.p. route,

caused similar and dose-related analgesic effects, mainly when assessed towards neurogenic pain. These results suggest that plants of the *Phyllanthus* genus contain several classes of compounds which can act synergistically to inhibit pain.

8 - Taken together these findings suggest that plants of the *Phyllanthus* genus cause marked and dose-related analgesic effects when given either i.p. or orally in several models of nociception in mice, particularly against neurogenic pain. The mechanisms underlying such effects still remain unknown, but seem to be unrelated to activation of opioid receptors, inhibition of prostaglandin synthesis, release of endogenous glucocorticoids, interaction with serotonin receptors or synthesis, activation of  $\alpha$ -adrenergic receptors or interaction with the L-arginine-nitric oxide pathway. In addition, the analgesic effects of HEs obtained from the various *Phyllanthus* species their active principles, seem to be unrelated to either peripheral or central depression. However, our results suggest that the antinociceptive action of HEs and active principle may involve, at least in part, interaction with neuropeptides, such as tachykinins. The possibility that these active principles can also interact with excitatory amino acids, such as glutamate and aspartate, it await further studies. Thus, these results extend previous data and open new favorable possibilities for their use in the management of pain, especially neurogenic pain, thus confirming their medicinal use for the treatment of kidney and bladder calculi.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J. Non competitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 24: 319-321, 1986.
- ALMAY, B.G.L.; HAGGENDAL, J.; VON KNORRING, L.; ORELAND, L. 5-HIAA and HVA in CSF in patients with idiopathic pain disorders. *Biol. Psychiat.*, 22: 403-412, 1987.
- ALREJA, M.; MUTALIK, P.; NAYAR, U.; MANCHANDA, S.K. The formalin test a tonic pain model in the primate. *Pain*, 20: 97-105, 1984.
- AMANN, R.; MAGGI, C.A. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sci.*, 49: 849-856, 1991.
- ANSUATEGUI, M.; NAHARRO, L.; FERIA, M. Noradrenergic and opioidergic influences on the antinociceptive effect of clomipramine in the formalin test in rats. *Psychopharmacology*, 98: 93-96, 1989.
- ARDID, D.; ESCHALIER, A.; LAVAREMSE, J. Evidence for a central but not a peripheral analgesic effect of clomipramine in rats. *Pain*, 45: 95-100, 1991.
- AUERBACH, S.; FORMAL, C.; JACOBS, B.L. Response of serotonin-containing neurons in nucleus raphe magnus to morphine, noxious stimuli, and periaqueductal gray stimulation in freely moving cats. *Exp. Neurol.*, 88: 609-628, 1985.
- BARALE, R.; ZUCCONI, D.; BERTANI, R.; LOPRIENO, N. Vegetables inhibit, in vivo, the mutagenicity of nitrite combined with nitrosable compounds. *Mutat. Res.*, 120: 145-150, 1983.
- BASBAUM, A.L.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.*, 7: 309-338, 1984.
- BATTAGLIA, G.; RUSTIONI, A. Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion neurons of the rat and monkey. *J. Comp. Neurol.*, 277: 302-312, 1988.
- BEASLEY, R.P.; HWANG, L.-Y.; LIN, L.-C.; CHIEN, C.-S. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. *Lancet II*: 1129-1133, 1981.



- BEITEL, R.E.; DUBNER, R. Response of unmyelinated (c) polymodal nociceptors to thermal stimuli applied to monkey's face. *J. Neurophysiol.*, 39: 1160-1175, 1976.
- BENTLEY, G.A.; NEWTON, S.H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephalin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *Br. J. Pharmacol.*, 73: 325-333, 1981.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol. Rev.*, 67: 67-186, 1987.
- BIEGON, A.; SAMUEL, D. Interaction of tricyclic antidepressants with opiate receptor. *Biochem. Pharmacol.*, 29: 460-462, 1980.
- BLANE, G.F. Blockade of bradykinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. *J. Pharmacol.*, 19: 367-373, 1967.
- BLUMBERG, H.; WOLF, P.S.; DAYTON, H.B. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonists. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 118: 763-766, 1965.
- BLUMBERG, B.S.; MILLMAN, I.; VENKATESWARAN, P.S.; THYAGARAJAN, S.P. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma-treatment of HBV carries with *Phyllanthus amarus*. *Cancer Detect. Prevent.*, 14: 195-201, 1989.
- BUTELMAN, E.R.; WOODS, J.H. Effects of clonidine, deximedetomidine and xylazine on thermal antinociception in rhesus monkeys. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 264, 762-769, 1992.
- CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A.; NETO, A.S.O.; VALLE, R.M.R.; RAE, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*: a comparative study with papaverine. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 17, 313-321, 1984.
- CARLI, G.; FARABOLLINI, F.; FONTANI, G. Effects of pain, morphine and naloxone on the duration of animal hypnosis. *Behav. Brain Res.*, 2: 373-385, 1981.

- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HÖKFELT, T. Effects of some antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain catecholamine stores by 4,4-dimethyl-meta-tyramine. *Eur. J. Pharmacol.*, 5: 367-373, 1969a.
- CARLSSON, A.; CORRODI, H.; FUXE, K.; HÖKFELT, T. Effect of antidepressant drugs on the depletion of intraneuronal brain 5-hydroxytryptamine caused by 4-methoxy- $\alpha$ -ethyl-meta-tyramine. *Eur. J. Pharmacol.*, 5: 357-366, 1969b.
- CARTER, R.B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*, 47: 211-220, 1991.
- CHAPMAN, V.; DICKENSON, A.H. The spinal and peripheral roles of bradykinin and prostaglandins in nociceptive processing in the rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 219: 427-433, 1992.
- CHAU, T.T. Analgesic testing in animal models. *Pharmacol. Meth. Control Inflamm.*, 195-212, 1989.
- CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C. In *Glossary of Indian Medicinal Plants*. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1956.
- CODERRE, T.J.; KATZ, J.; VACCARIANO, A.L.; MELZACK, R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52: 259-285, 1993.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Increased pain sensitivity following heat injury involves a central mechanism. *Behav. Brain Res.*, 15: 259-262, 1985.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.*, 131: 71-74, 1991.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.*, 3665-3670, 1992a.
- CODERRE, T.J.; MELZACK, R. The role of NMDA receptor-operated calcium channels in persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J. Neurosci.*, 3671-3675, 1992b.

- CODERRE, T.J.; YASHPAL, K. Intracellular messengers contributing to persistent nociception and hyperalgesia induced by L-glutamate and substance P in the rat formalin pain model. *Eur. J. Pharmacol.*, 6: 1328-1334, 1994.
- COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 32: 295-310, 1968.
- CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 110: 193-198, 1993.
- COWAN, A.; PORRECA, F.; WHEELER, H. Use of the formalin test in evaluation analgesics, *NIDA. Res. Monog.*, 95: 116-122, 1989.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 72: 74 - 79, 1941.
- DAVERY, N.J., MORRISSEY, S.E.; HASTINGS, L.H.; LAYCACK, J.F. The effect of *Phyllanthus sellowianus* extract in streptozotocin diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, 112 (sup): 368 p, 1994.
- DEBIASI, S.; RUKSTIONI, A. Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7820-7824, 1988.
- DE FELIPE, M.C.; DE CEBALLOS, M.L.; FUENTES, J.A. Hypoalgesia induced by antidepressants in mice: a case for opioid and serotonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 125: 193-199, 1986.
- DHIR, H.; ROY, A.K.; SHARMA, A.; TALUKDER, G. Protection afforded by aqueous extracts *Phyllanthus* species against cytotoxicity induced by Lead and Aluminum salts. *Phytother. Res.*, 4: 172-176, 1990.
- DICKENSON, A.H. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol. Sci.*, 11: 307-309, 1990.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology*, 26: 1235-1238, 1987a.

- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post-formalin. *Pain*, 30: 349-360, 1987b.
- DOOD, R.; NORTH, N. Increased risk for lethal forms of liver disease among HBsAg-positive blood donors in the United States. *J. virol. Methods* 17: 81-94, 1987.
- DUARTE, I.D.G.; DOS SANTOS, I.R.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide-GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 217: 225-227, 1992.
- DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. *Eur. J. Pharmacol.*, 186: 289-293, 1990.
- 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.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Amer. Pharm. Assoc.*, 46: 208-209, 1957.
- EDDY, N.B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 107: 385-393, 1953.
- ELMEKKAWY, S.; MESELHY, M.R.; KUSUMOTO, I.T.; KADOTA, S.; HATTORI, M.; NAMBA, T. Inhibitory effects of egyptian folk medicines on human immunodeficiency virus (HIV) reverse transcriptase. *Chem. Pharm. Bull.*, 43: 641-648, 1995.
- FARNSWORTH, N.R.; MORRIS, R.W. Higher plants-the sleeping giant of drug development. *Am. J. Pharmac. Educ.*, 148: 46-52, 1976.
- FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; FACCIOLI, L.H. Blockade of hyperalgesia and neurogenic oedema by topical application of nitroglycerin. *Eur. J. Pharmacol.*, 217: 207-209, 1992.
- FIALIP, J.; AMAITRE, O.; BOUGEROLLE, A.M.; BERGER, Z.A.; ESCHALIER, A.; MARTY, H. Antinociceptive activity of metopramine in mice. Relationship with its pharmacokinetic properties. *Life Sci.*, 50: 161-168, 1992.

- FIELDS, H.L.; HEINRICHER, M.M.; MASON, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14: 219-245, 1991.
- FLEMING, W.W.; WESTPHALL, D.P.; DE LA LANDE, I.S.; JELLET, L.B. Log-normal distribution of equieffective doses of norepinephrine and acetylcholine in several tissues. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 181: 339-345, 1972.
- GALIBERT, F.; CHEN, T.N.; MANDART, E. Localization and nucleotide sequence of the gene coding for the woodchuck hepatitis virus surface antigen: Comparison with the gene coding for the human hepatitis B virus surface antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5315-5319, 1981.
- GAMSE, R.; MOLNAR, A.; LEMBECK, F. Substance P release from spinal cord slices by capsaicin. *Life Sci.* 25: 629-636, 1979.
- GAMSE, R.; LACKNER, D.; GAMSE, G.; LEEMAN, S.E. Effect of capsaicin pretreatment on capsaicin-evoked release of immunoreactive somatostatin and substance P from primary afferent neurons. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 316: 38-41, 1981.
- GORSKI, F.; CORRÊA, C.R.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Potent antinociceptive activity of the hydroalcoholic extract from *Phyllanthus corcovadensis*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45: 1046-1049, 1993.
- GO, V.L.W.; YAKSH, T.L. Release of substance P from the cat spinal cord. *J. Physiol.*, 391: 141-167, 1987.
- GUST, I.D.; BURRELL, C.J.; COULEPIS, A.G.; ROBINSON, W.S.; ZUCKERMAN, A.J. Taxonomic classification of human hepatitis B virus, *Intervirology*, 25: 14-29, 1986.
- HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in rat. *Neuropharmacology*, 31, 51-58, 1992.
- HALEY, J.E.; SULLIVAN, A.F.; DICKENSON, A.H. Evidence for spinal N-methyl-D-aspartate receptor involvement in prolonged chemical nociception in rat. *Brain Res.*, 518: 218-226, 1990.

- HARDY, J.D.; WOLFF, H.G.; GOODELL, H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J. Clin. Invest.*, 29: 115-140, 1950.
- HEAPY, C.G.; JAMIESON, A.; RUSSELL, N.J.W. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 90: 164p, 1987.
- HUGHES, R.A.; SUFKA, K.J. Morphine hyperalgesic effects on the formalin test in domestic fowl (*Gallus gallus*). *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38: 247-251, 1991.
- HUNSKAAR, S.; BERGE, 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.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. *J. Neurosci. Meth.*, 14: 69-76, 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30: 103-114, 1987.
- HWANG, A.S.; WILCOX, G.L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. *Pain*, 28: 343-355, 1987.
- IADOROLA, M.J.; DOUGLASS, J.; CIVELLI, O.; NARANJO, J.R. Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. *Brain Res.*, 455: 205-212, 1988.
- ISHIMARU, K.; YOSHIMATSU, K.; YAMAKAWA, T.; KAMADA, H.; SHIMOMURA, K. Phenolic constituents in tissue cultures of *Phyllanthus niruri*. *Phytochemistry*, 31: 2015-2018, 1992.
- JANCSÓ, G.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J.M.; KIRALY, E.; HALASZ, N.; NILSSON, G.; TERENIUS, L.; REHFELD, J.; STEINBUSCH, H.; VERHOFSTAD, A.; ELDE, E.; SAID, S.; BROWN, M. Immunohistochemical studies on the effects of capsaicin on spinal and medullary peptide and monoamine neurons using antisera to substance P, gastrin CCK, somatostatin, VIP, enkephalin, neurotensin and 5-HT. *J. Neurocytol.*, 10: 963-980, 1981.

- KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T.; SUGIMOTO, A.; MATSUNO, R.; YAMADA, S. Antinociceptive action of tizanidine in mice and rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 330: 93-96, 1985.
- KANUI, T.I.; HOLE, K.; MIARON, J.O. Nociception in crocodiles-capsaicin instillation, formalin and hot plate tests. *Zool. Sci.*, 7: 537-540, 1990.
- KAPLAN, H.A.; GREENMANN, R.L.; GERIN, J.L.; PURCELL, R.H.; ROBINSON, W.S. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.*, 12: 995-1005, 1973.
- KATZ, J.; VACCARINO, A.L.; CODERRE, T.J.; MELZACK, R. Injury prior to neurectomy alters the pattern of autotomy in rats: behavioral evidence of central neural plasticity. *Anesthesiology*, 75: 876-883, 1991.
- KAWABATA, A.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. L-arginine exerts a dual role in nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. *Br. J. Pharmacol.*, 109: 73-79, 1993.
- KAYSER, V.; GUILBAUD, G.; BESSON, J.M. Potent antinociceptive effects of clonidine systemically administered in an experimental model of clinical pain, the arthritic rat. *Brain Res.*, 593: 7-13, 1992.
- KITTO, K.F.; HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci. Lett.*, 148: 1-5, 1992.
- KUPCHAN, S.M.; LA VOIE, E.J.; BRANFMAN, A.R.; FEI, B.Y.; BRIGHT, W.M.; BRYAN, R.F. Phyllanthocin, a novel bisabolane aglycone from the antileukemic glycoside phyllanthoside. *J. Am. Chem. Soc.*, 99: 3199-3201, 1978.
- LAMOTTE, R.H.; SHAIN, C.N.; SIMONE, D.A.; TSAI, E.-F.P. Neurogenic hyperalgesia psychophysical studies of underlying mechanisms. *J. Neurophysiol.*, 66: 190-211, 1991.
- LAVIELLE, S.; CHASSAING, G.; PLOUX, O.; LOEUILLET, D.; BESSEYRE, J.; JULIEN, S.; MARQUET, A.; CONVERT, O.; BEAUJOUAN, J.C.; TORRENS, Y.; BERGSTRÖM, L.; SAFFROY, M.; GLOWINSKI, J. Analysis of tachykinins binding site interactions using constrained analogs of tachykinins. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 41-49, 1988.

- LEIJON, G.; BOIVIE, J. Central post-stroke pain: a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. *Pain*, 36: 27-36, 1989.
- LEMBECK, F. The 1988 Ulf von Euler Lecture. Substance P: from extract to excitement. *Acta Physiol. Scand.*, 133: 435-454, 1988.
- LIPP, J. Possible mechanisms of morphine analgesia. *Clin. Neuropharmacol.*, 14: 131-147, 1991.
- MAGGI, C.A.; SANTICIOLI, P.; REGOLI, D.; MELI, A. Peripheral effects of neurokinins: functional evidence for the existence of multiple receptors. *J. Auton. Pharmac.*, 7: 11-32, 1987.
- MAGNI, G. On the relationship between chronic pain and depression when there is no organic lesion. *Pain*, 31: 1-21, 1987.
- MAGNI, G. The use of antidepressants in the treatment of chronic pain. A review of the current evidence. *Drugs*, 42: 730-748, 1991.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science*, 257: 1276-1279, 1992a.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Antinociceptive actions of spinal non-steroid anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *Brain Res.*, 263: 136-146, 1992b.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain*, 54: 291-300, 1993.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E<sub>2</sub> using microdialysis in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.*, 114: 1069-1075, 1995.
- MALSEED, R.T.; GOLDSTEIN, J.F. Enhancement of morphine analgesia by tricyclic antidepressants. *Neuropharmacology*, 18: 827-829, 1979.



- MAO, J.; PRICE, D.D.; MAYER, D.J.; LU, J.; HAYES, R.L. Intrathecal MK-801 and local nerve anesthesia synergistically reduce nociceptive behaviours in rats with experimental peripheral mononeuropathy. *Brain Res.*, 576: 254-262, 1992.
- MARKUS, H.; POMERANZ, B.; KRUSHELNYCKY, D. Spread of saphanous somatotopic projection map in spinal cord and hypersensitivity of the foot after chronic sciatic denervation in adult rat. *Brain Res.*, 296: 27-39, 1984.
- MELLER, S.T.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. *Neuroscience*, 50: 7-10, 1992.
- MELZACK, R.; MELINKOFF, D.F. Analgesia produced by brain stimulation: evidence of a prolonged onset period. *Exp. Neurol.*, 43: 369-374, 1974.
- MENÉTRY, D.; BESSON, J.-M. Electrophysiological characteristics of dorsal horn cells in rats with cutaneous inflammation resulting from chronic arthrites. *Pain*, 13: 343-364, 1982.
- MILLMAN, I.; SOUTHAM, L.; HALBHERR, T.; SIMMONS, H.; KANG, C.M. Woodchuck hepatitis virus: experimental infection and natural occurrence. *Hepatology*, 4: 817-823, 1984.
- MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C.; WALLACE, P.; HART, S.L. L-N<sup>o</sup>-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, 102, 198-202, 1991.
- MORRIS, R.; SOUTHAM, E.; BRAID, D.J.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglia neurones and their satellite cells. *Neurosci. Lett.*, 137: 29-32, 1992.
- MORTON, J.F. *Atlas of Medicinal Plants in Middle America - Bahamas to Yucatan*. 1st ed., Springfield: Charles C. Thomas (ed.), 1981. p. 457-463.
- MURRAY, C.W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. *J. Pharmacol. Meth.*, 20: 175-186, 1988.

- NEUGEBAUER, V.; SCHAIBLE, H.-G. Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cats' knee. *J. Neurophysiol.*, 64: 299-311, 1990.
- OBASI, B.N.B.; IGBOECHI, C.A.; ANUFORO, D.C.; AIMUFUA, K.N. Effects of extracts of *Newbouldia laevis*, *Psidium guajava* and *Phyllanthus amarus* on gastrointestinal tract. *Fitoterapia*, 64: 235-238, 1993.
- O'CALLAGHAN, J.P.; HOLTZMAN, S.G. Quantification of the analgesic of narcotic antagonists by a modified hot plate procedure. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 192: 497-505, 1975.
- OGATA, T.; HIGUCHI, H.; MOCHIDA, S.; MATSUMOTO, H.; KATO, A.; ENDO, T., KAJI, A.; KAJI, H. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor from *Phyllanthus niruri*. *AIDS Res. Hum. Retrov.*: 8, 1937-1944, 1992.
- OLIVER-BEVER, B. Medicinal plants in tropical West Africa III. Anti-infection therapy with higher plants. *J. Ethnopharmacol.*, 9, 1-83, 1983.
- PANERAI, A.E.; BIANCHI, M.; SACERDOTE, P.; RIPAMONTI, C.; VENTRAFRIDDA, V.; DE CONNO, F. Antidepressants in cancer pain. *J. Palliat. Care*, 7: 42-44, 1991.
- PERRY, L.M.; METZGER, J. *Medicinal plants of East and Southeast Asia: Attributed properties and uses*. Cambridge : MIT Press, 1980. p. 149-151.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; NIVEN, M.L.; NASSIMBENI, L.R. Structure of the principal antineoplastic glycosides of *Phyllanthus acuminatus* Vahl. *Can. J. Chem.*, 61: 2630-2632, 1983.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I.; GUST, D.; BOETTNER, F.E.; WILLIAMS, M.; SAENZ-RENAULD, J.A.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M.; ELLIS, P.D. Antineoplastic agents 104. Isolation and structure of the *Phyllanthus acuminatus* Vahl. (euphorbiaceae) glycosides. *J. Org. Chem.*, 49: 4258-4266, 1984.
- PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; SUFFNESS, M.I. Phyllanthostatin 1. phyllanyhoside orthoacid rearrangement. *J. Org. Chem.*, 50: 5060-5063, 1985.

- PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E.; NIEMAN, R.A.; DUFRESNE, C.; SAENZ-REUNAUD, J.A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin 6. *J. Nat. Prod.*, 53: 1406-1413, 1990.
- PIERCEY, M.F.; SCHROEDER, L.A.; FOLKERS, K.; XU, J.-C.; HORIG, J.-C. Sensory motor functions of spinal cord substance P. *Science*, 214: 1361-1363, 1981.
- POLYA, G.M.; WANG, B.H.; FOO, L.Y. Inhibition of signal-regulated protein kinases by plant-derived hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, 38: 307-314, 1995.
- QUIRION, R.; DAM, T.V. Multiple neurokinin receptors: recent developments. *Reg. Peptides*, 22: 18-25, 1988.
- REN, K.; HYLDEN, J.L.K.; WILLIAMS, G.M.; RUDA, M.A.; DUBNER, R. The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia a dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain*, 50: 331-344, 1992.
- ROSLAND, J.H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. *Pain*, 45: 211-216, 1991.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, 31: 1279-1285, 1992.
- SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; YOGO, H.; TAN-NO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. *Neurosci. Lett.*, 151, 142-145, 1993.
- SANTOS, A.R.S.; CECHINEL FILHO V.; NIERO, R.; VIANA, A.M.; MORENO, F.N.; CAMPOS, M.M.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species of *Phyllanthus*. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 755-759, 1994.
- SANTOS, D. R. dos. Chá de quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) na litíase urinária em humanos e ratos. PhD thesis, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, pp. 157, 1990.

- SATYANARAYAN, P.; SUBRAHMANYAN, P.; VISWANATHAN, K.N.; WARD, R.S. New seco and hydroxy-lignans from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 51: 44-49, 1988.
- SCHOUBENBOURG, J.; DICKENSON, A.H. The effects of a distant noxious stimulation on A and C fibre evoked flexion reflexes and neuronal activity in the dorsal horn of the rat. *Brain Res.* 328: 23-32, 1985.
- SHARAV, Y.; SINGER, E.; SCHMIDT, E.; DIONNER, A.; DUBNER, R. The analgesic effect of amitriptyline on chronic facial pain. *Pain*, 31: 199-209, 1987.
- SHEAD, A.; VICKERY, K.; PAJKOS, A.; MEDHURST, R.; FREIMAN, J.; DIXON, R.; COSSART, Y. Effects of *Phyllanthus* plant extracts on duck hepatitis B in vitro and in vivo. *Antiviral Res.*, 18: 127-138, 1992.
- SHIBATA, M.; OHKUDO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38: 347-352, 1989.
- SHIMIZU, M.; HORIE, S.; TERASHIMA, S.; UENO, H.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SUZUKI, S.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. Active components of a Paraguayan crude "Parapara-mi", *Phyllanthus niruri*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 37: 2591-2532, 1989.
- SHIMA, K.; NAKAHAMA, H.; YAMAMOTO, M.; AYA, K.; INASE, M. Effects of morphine on two types of nucleus raphe dorsalis neurons in awake cats. *Pain*, 29: 375-386, 1987.
- SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. A method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 95: 729-731, 1957a.
- SIEGMUND, E.A.; CADMUS, R.A.; LU, G. Screening analgesics, including aspirin-type compound, based upon the antagonism of chemically induced "writhing" in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 119: 184-193, 1957b.
- SINGH, B.; AGRAWAL, P.K.; THAKUR, R.S. A new lignan and a new neolignan from *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 52: 48-51, 1989.

- SKILLING, S.R.; SMULLIN, D.H.; BEITZ, A.J.; LARSON, A.A. Extracellular amino acid concentrations in the dorsal spinal cord of freely moving rats following veratridine and nociceptive stimulation. *J. Neurochem.*, 51: 127-132, 1988.
- SNYDER, S.H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Science*, 257: 494-496, 1992.
- SORKIN, L.S.; WESTLUND, K.N.; SLUKA, K.A.; DOUGHERTY, P.M.; WILLIS, W.D. Neural changes in acute arthritis in monkeys. IV. Time course of amino acid release into the lumbar dorsal horn. *Brain Res. Rev.*, 17: 39-50, 1992.
- SZOLCSÁNYI, J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: HAKANSON, R.; SUNDLER, F. (Eds.) *Tachykinin Antagonists*. Amsterdam: Elsevier, 1985. p. 45-56.
- TABER, R.I.; GREENHOUSE, D.D.; IRWIN, S. Inhibition of phenylquinone-induced writhing by narcotic antagonists. *Nature*, 204: 189-190, 1964.
- TABER, R.I.; LATRANYI, M.B. Antagonism of the analgesic effect of opioid and non-opioid agents by p-chlorophenylalanine (PCPA). *Eur. J. Pharmacol.*, 75: 215-222, 1981.
- TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; UEDA, H.; AMANO, H. Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-tyrosyl-L-arginine (kyotorphin) and its analogue. *Eur. J. Pharmacol.*, 55: 109-111, 1979a.
- TAKAGI, H.; SHIOMI, H.; UEDA, H.; AMANO, H. A novel analgesic dipeptide from bovine brain is a possible met-enkephalin release. *Nature*, 282: 410-412, 1979b.
- TAKAHASHI, H.; OHKUDO, T.; SHIBATA, M.; NARUSE, S. A modified formalin test for measuring analgesia in mice. *Jpn. J. Oral Biol.*, 26: 543-548, 1984.
- TAIWO, Y.O.; FABIAN, A.; PAZOLES, C.J.; FIELDS, H.L. Potentiation of morphine antinociception by monoamine reuptake inhibitors in the rat spinal cord. *Pain*, 21: 329-337, 1985.

- TASKER, R.A.R.; CONNELL, B.J.; YOLE, M.J. Systemic injection of alfa-1 adrenergic agonists produce antinociception in the formalin test. *Pain*, 49, 383-391, 1992.
- TEMPESTA, M.S.; CORLEY, D.G.; BEUTLER, J.A.; METRAL, C.J.; YUNES, R.A.; GIACOMOZZI, C.D.; CALIXTO, J.B. Phyllanthimide, a new alkaloid from *Phyllanthus sellowianus*. *J. Nat. Prod.*, 51: 617-618, 1988.
- THOMAS, H.C.; SCULLY, L.J. Antiviral therapy in hepatitis B infection. *Br. Med. Bull.*, 41: 374-380, 1985.
- THYAGARAJAN, S.P.; SUBRAMANIAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; VENKATESWARAN, P.S.; BLUMBERG, B.S. Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet II*, 764-766, 1988.
- TJØLSEN, A., BERGE, O.-G., HUNSKAAR, S., ROLAND, J.H. and HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51: 5-17, 1992.
- TSIQUAYE, R.; ZUCKERMAN, A. Suramin inhibits duck hepatitis B virus DNA polymerase activity. *J. Hepatol.*, 1: 663-669, 1985.
- UEDA, H.; YOSHIHARA, Y.; FUKUSHIMA, N.; SHIOMI, H.; NAKAMURA, A.; TAKAGI, H. Kyotorphin (tyrosil-arginine) synthetase in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 262: 8165-8173, 1987.
- UENO, H.; HORIE, S.; NISHI, Y.; SHAGAWA, H.; KAWASAKI, M.; SUZUKI, S.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; SHIMIZU, M.; YOSHIZAKI, M.; MORITA, N. Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin, an angiotensin converting enzyme inhibitor from "Paraparai Mi", *Phyllanthus niruri*. *J. Nat. Prod. (Lloydia)*, 51: 357-359, 1988.
- UHLÉN, S., PERSSON, M.-L.; ALARI, L.; POST, C.; AXELSSON, K.L.; WIKBERG, J.E.S. Antinociceptive actions of  $\alpha_2$  adrenoceptor agonists in the rat spinal cord: Evidence for antinociceptive  $\alpha_2$  adrenoceptors from cyclic AMP. *J. Neurochem.*, 55: 1905-1914, 1990.

- UNANDER, D.W. Callus induction in *Phyllanthus* species and inhibition of viral DNA polymerase and reverse transcriptase by callus extracts. *Plant Cell Reports*, 10: 461-466, 1991.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Records of usage or assays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*) I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblia*. *J. Ethnopharmacol.*, 30: 233-264, 1990.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*): a compilation II. The subgenus *Phyllanthus*. *J. Ethnopharmacol.*, 34: 97-133, 1991.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*): a compilation III. The subgenera *Eriococcus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthys*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in the three-part series. *J. Ethnopharmacol.*, 36: 103-112, 1992.
- UNANDER, D.W.; WEBSTER, G.L.; BLUMBERG, B.S. Uses and bioassays in *Phyllanthus* (*Euphorbiaceae*). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *J. Ethnopharmacol.*, 45: 1-18, 1995.
- VENKATESWARAN, P.S.; MILLMAN, I.; BLUMBERG, B.S. Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses: In vivo and in vitro studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84: 274-278, 1987.
- VENTAFRIDDA, V.; BIANCHI, M.; RIPAMONTI, C.; SACERDOTE, P.; DE CONNO, F.; ZECCA, E.; PANERAI, A.E. Studies on the effects of antidepressant drugs on the antinociceptive action of morphine and on plasma morphine in rats and man. *Pain*, 43: 155-162, 1990.
- VERGE, V.M.; XU, X.-J.; WIESENFELD-HALLIN, Z.; HÖKFELT, T. Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. In situ hybridization and functional studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 11617-11621, 1992.

- VON VOIGTLANDER, P.F.; LEWIS, R.A.; NEFF, G.L. Kappa opioid analgesia is dependent on serotonergic mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 231: 270-274, 1984.
- WALL, P.D.; SCADDING, J.W.; TOMKIEWICZ, D. The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. *Pain*, 6: 179-182, 1979.
- WALSH, T.D. Antidepressants in chronic pain. *Clin. Neuropharmacol.*, 6: 271-295, 1983.
- WARD, N.G.; BLOOM, V.L.; FRIEDEL, R.O. The effectiveness of tricyclic antidepressants in the treatment of coexisting pain and depression. *Pain*, 7: 311-338, 1979.
- WEBSTER, G.L. The genera of Euphorbiaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arboretum* 48: 303-361; 363-430, 1967.
- WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Int. J. Neuropharmacol.*, 3: 369-378, 1964.
- WOOD, M.J.; GEDDES, A.M. Antiviral therapy. *Lancet* II: 1189-1987, 1987.
- WOOLF, C.J. Long term alterations in the excitability of the flexion reflex produced by peripheral tissue injury in the chronic decerebrate rat. *Pain*, 18: 325-343, 1984.
- WOOLF, C.J.; THOMPSON, S.W.N. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartate acid receptor activation implications for post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*, 44: 293-299, 1991.
- WOOLFE, G.; MAC DONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 80: 300-307, 1944.
- YAKSH, T.L. Pharmacology of spinal adrenergic system with modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22: 845-858, 1985.
- YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 202: 411-428, 1977.



- YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. *Anesth. Analg.*, 77: 886-890, 1993.
- YAMAMOTO, T.; YAKSH, T.L. Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by incomplete ligation of sciatic nerve: excitatory amino acids. *Pain*, 49: 121-128, 1992.
- YEH, S.F.; HONG, C.Y.; HUANG, Y.L.; LUI, T.Y.; CHOO, K.B.; CHOU, C.K. Effect of an extract from *Phyllanthus amarus* on hepatitis B surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.*, 20: 185-192, 1993.
- ZHUO, M.; GEBHART, G.F. Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain*, 42: 337-350, 1990.
- ZIMER, P.O.; WYNN, R.L.; FORD, R.D.; RUDO, F.G. Effect of hot plate temperature on the antinociceptive activity of mixed opioid antagonist compounds. *Drug. Dev. Res.*, 7: 277-280, 1986.