



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória de frações biologicamente
ativas de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Mull. Arg.

Aluno voluntário: William Nascimento Litaiff Nogueira

MANAUS

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL PIBIC 2011/2012

PIB-S/0016/2011

Voluntário: William Nascimento Litaiff Nogueira
Orientadora: Profa. Dra. Cinthya Iamille Frithz Brandão de Oliveira

MANAUS

2012

Resumo

A *Aspidosperma nitidum* é uma planta utilizada popularmente como agente gastroprotetor e antiinflamatório, pelas comunidades tradicionais da região amazônica, porém com poucos trabalhos científicos publicados. Com o objetivo de avaliar a ação antinoceptiva e antiinflamatória do macerado do extrato aquoso das cascas de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Mull. Arg. (AN), realizamos pesquisa com os modelos de atividade nociceptiva induzida por ácido acético e por formalina, em camundongos, que demonstraram efeito antinoceptivo da AN, especialmente na concentração de 30 mg/kg, no modelo da placa quente pudemos observar que este efeito não era mediado via espinal; na pesquisa da atividade antiinflamatória, podemos observar esta resposta na inflamação crônica induzida por granuloma, em ratos, nas concentrações de 30 e 100 mg/kg, sem no entanto podermos confirmar sua ação em modelo agudo, do edema de pata, na concentração testada de 100 mg/kg. Estudos posteriores podem confirmar esta atividade em concentrações menores, todavia este estudo vem confirmar o efeito antinoceptivo e antiinflamatório de AN nos modelos testados e, de acordo com outros trabalhos de nosso grupo, o mecanismo de ação desta ação pode estar relacionado à via das prostaglandinas ou ao óxido nítrico.

Palavras Chaves: Antinocicepção; Antiinflamatório; Carapanauba; Camundongos.

Sumário

Resumo	iii
1. Introdução.	5
2. Objetivo.	7
2.1. Objetivo.	7
2.2. Objetivo Específico	7
3. Levantamento Bibliográfico	8
4. Metodologia.	10
4.1. Isolamento dos constituintes químicos das espécies de <i>A. nitidum</i> .	10
4.2. Animais e considerações de ética.	10
4.3. Atividade antinociceptiva.	10
4.3.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético.	10
4.3.2. Ensaio de nocicepção induzida por Formalina.	11
4.3.3. Ensaio da Placa Quente.	12
4.4. Atividade antiinflamatória.	12
4.4.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina.	12
4.4.2. Inflamação crônica induzida por granuloma (“pellet”) de algodão.	13
4.5. Atividade Antitérmica.	13
4.5.1. Modelo de ação na resposta térmica induzida por <i>Saccharose cerevisiae</i> .	13
4.6. Análise Estatística.	14
5. Resultados e Discursão.	15
5.1. Atividade Antinociceptiva.	15
5.1.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético.	15
5.1.2. Ensaio de nocicepção induzida por formalina.	16
5.1.3. Ensaio de nocicepção no modelo da Placa Quente.	17
5.2. Atividade Antiinflamatória.	18
5.2.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina.	18
5.2.2. Efeito na inflamação pelo granuloma induzido por “pellet” de algodão.	19
5.3. Atividade antitérmica.	21
5.3.1. Resposta térmica induzida por <i>Saccharose cerevisiae</i> .	21
6. Conclusão.	22
7. Referências Bibliográficas.	23
Anexo.	24

1 . Introdução

Desde os tempos antigos, os produtos naturais, em especial aqueles de origem vegetal, tem sido consistentemente, uma importante fonte de agentes terapêuticos. Atualmente, cerca de 25-30% de todas as drogas disponíveis no mercado farmacêutico são derivados de produtos naturais (plantas, micróbios e animais). Apesar de, nas últimas décadas, especialmente devido ao avanço da química combinatória, a investigação de produtos naturais pela indústria farmacêutica tem experimentado um declínio lento. Entretanto, evidências recentes deste mercado, mostram que as empresas têm investido em algumas doenças complexas, e que os produtos naturais continuam a representar uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas formas químicas, pois apresentam estruturas privilegiadas, selecionadas por mecanismos que evoluíram durante milhões de anos (CALIXTO *et al.*, 2005).

A validação de plantas medicinais tem sido a busca dos farmacologistas a fim de propiciar uma estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, com segurança, tanto para os profissionais quanto aos pacientes que deles usufruem (LAPA *et al.*, 2002).

O potencial dos produtos de origem natural, como fontes de novas drogas, continua largamente inexplorado uma vez que somente pequena fração de plantas, animais e microorganismos têm sido investigados fitoquímica e biologicamente (HAMBURGER, HOSTETTMANN, 1991).

Aspidosperma nitidum, espécie nativa da região amazônica, amplamente distribuída, sendo uma árvore grande porte, presente em terra firme. Entre outras atividades, é amplamente utilizada como antiinflamatório. Também é atribuída à mesma as ações anticoncepcional, hepatoprotetora, anti-úlceras, adstringente, anti-malária, febrífuga, cicatrizante, além de ser usada no tratamento do diabetes e de várias afecções pulmonares, como a asma e bronquite (CID, 1978; BALBACH, 1969).



Fig. 01. Espécie adulto de *Aspidosperma nitidum*. Foto: Cinthya Iamile, Floresta do Campus Universitário da UFAM.

Pereira *et al* (2004), constataram efeitos antiinflamatórios do extrato aquoso do macerado das cascas de *AN*. O presente estudo propõe a investigação, por meio de ensaios farmacológicos *in vivo*, das possíveis ações antinociceptivas e/ou antiinflamatórias de frações e/ou compostos isolados de espécies de *Aspidosperma nitidum*, bem como a investigação de seus possíveis mecanismos de ação.

A reação inflamatória, devido ao seu papel de destruição de organismos invasores e remoção de debris celulares, possui um caráter potencialmente lesivo ao tecido circujacente. Logo, esta resposta deve ser bem ordenada e controlada pelo organismo. (LAPA, 2002)

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Este projeto tem como objetivo o estudo farmacológico da *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Mull. Arg., visando à identificação de novos protótipos de fármacos analgésicos e/ou antiinflamatórios.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar o estudo farmacológico das frações ou compostos isolados da casca de *Aspidosperma nitidum* (AN) visando a atividade analgésica e/ou antiinflamatória;

- Realizar ensaios de nocicepção (contorção abdominal, nocicepção induzida por formalina, teste da placa quente), inflamação (edema de pata, granuloma induzido por “pellets” de algodão) e febre induzida por *Saccharomices cerecisiae* em animais tratados com frações etanólicas de AN;

- Capacitar estudantes de graduação para atuarem em pesquisa e desenvolvimento tecnológico com uma abordagem multidisciplinar na pesquisa farmacológica;

- Melhorar a produção científica dos grupos envolvidos no projeto, pela publicação em revistas com maior fator de impacto.

3. Levantamento Bibliográfico

No Brasil, especialmente na Região Norte, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem importância fundamental no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a dificuldade de acesso aos centros urbanos, as diferenças culturais, sociais e econômicas das populações ribeirinhas, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais, em especial o indígena, e a disponibilidade da flora. Estudos já relataram a necessidade de ser feita uma atualização no uso de produtos naturais e propõem novos desafios e perspectivas quanto a popularização de uso seguro (PINTO *et al.*, 2002).

Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular. (MARTINS *et al.*, 2000)

Com o desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica. Esforços têm sido feitos no sentido de melhorar as substâncias naturais aumentando as propriedades desejadas e minimizando seus efeitos colaterais adversos. (SCHULZ *et al.*, 2002).

A família *Apocynaceae* pode ser considerada uma das mais importantes fontes vegetais de constituintes químicos de utilidade na medicina moderna. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de espécies dessa família (por exemplo, alcalóides) e muitas dessas espécies representam modelos de classes farmacológicas distintas de drogas e fazem parte da história da Farmacologia e da Terapêutica. Várias espécies desta família têm sido ultimamente fonte de estudos de novas drogas, destacando-se entre elas as do gênero *Aspidosperma*(STASI. 2002).

Do extrato etanólico do cerne de *A. nitidum*, após sucessivos procedimentos cromatográficos, foram obtidos uma mistura de esteróides (β-sitosterol e estigmasterol), triterpenos pentacíclicos (β-amirina e lupeol), um inositol (L-2-O-metil-chiroinositol) e um alcalóide β-carbolínico, identificado como o ácido 3-harmanocarboxílico, descritos pela primeira vez na espécie. Todos os compostos foram identificados comparativamente tanto por meio de CCDS com amostras autênticas quanto por dados no IV e RMN descritos na literatura (PERREIRA *et al.*, 2006)

Testes para detecção das atividades analgésicas e antiinflamatórias são importantes para o desenvolvimento de drogas a partir de plantas medicinais, uma vez que a dor e a inflamação são comumente observadas, ao mesmo tempo, nas doenças inflamatórias. As drogas antiinflamatórias atualmente disponíveis para o tratamento das várias desordens inflamatórias têm um ou mais efeito adverso e indesejáveis efeitos colaterais (GEETHA *et al.*, 2001).

Inflamação é a resposta de um tecido vivo e vascularizado a um agente infeccioso, a um antígeno ou mesmo a um estímulo irritante de natureza física, química ou traumática. Esta resposta se manifesta pela presença de rubor (eritema), calor (aumento de temperatura na região inflamada), tumor (edema), dor e perda de função do tecido ou órgão afetado. O principal objetivo desta reação complexa e estereotipada parece ser facilitar o acesso, ao tecido lesado, de células, proteínas e fluido originários do sangue.

O papel da dor inflamatória, no processo de defesa do organismo, é claramente sinalizar a ocorrência de injúria tissular real ou iminente, limitando a movimentação com a finalidade de reduzir a amplitude de ação do agente etiológico ou de prevenir futuras lesões tissulares. A dor inflamatória é trazida a efeito pela liberação de mediadores inflamatórios que desencadeiam a sensibilização de nociceptores presentes nas terminações de fibras nervosas aferentes primárias. (LAPA, 2002).

A pesquisa básica, em modelos animais, tem permitido avaliar e conhecer a forma de ação de diversos agentes, neste caso em especial, vegetal, com o objetivo de determinar o nível de eficácia destes produtos, dito muitas vezes como inofensivos, e referendar ou não o conhecimento tradicional, a fim de podermos identificar os princípios ativos destas espécies e elucidar seu mecanismo de ação, com isto, a possibilidade de novos fitoterápicos serem reconhecidos no Brasil, fica mais próxima.

4. Metodologia

4.1. Isolamento dos constituintes químicos das espécies de *Aspidosperma nitidum*

As cascas de *Aspidosperma nitidum* (AN) foram coletadas na cidade de Manaus, no local conhecido como “Igarapé do Inferno”, no bairro da Colônia Antônio Aleixo. A identificação botânica foi realizada pelo laboratório de botânica da UFAM.

Os extratos das cascas de AN foram preparados por processo de maceração a temperatura ambiente, com etanol, após secagem e trituração das cascas. Deste macerado foram separadas as frações solúveis em solventes com polaridade diferentes a fim de arrastar em cada fase, diferentes substratos, os quais foram submetidos aos modelos biológicos propostos. Esta marcha fitoquímica foi realizada pelo grupo do Prof. Dr. Edilberto Silveira (CENAUREM/UFC).

4.2. Animais e considerações de ética

Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas (20-30g) e ratos Wistar, machos e fêmeas, (150-200g), oriundos do biotério da Universidade Federal do Amazonas. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos sob temperatura média de 22°C, em ciclos claro/escuro de 12/12 horas, recebendo ração padrão e água à vontade. Todos os protocolos seguirão estritamente as normas internacionais de cuidados com animais de laboratório. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFAM.

4.3. Atividade antinociceptiva

4.3.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético (Collier *et al*, 1968)

As contorções abdominais, em camundongos, caracterizam-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras. Esta resposta motora decorre da aplicação de um estímulo nociceptivo por via intra peritoneal.

O estimulante utilizado na maioria dos testes envolvendo este método é o ácido acético, este estimulante é conveniente para os testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação dos vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a

nociceção. Assim, este modelo é sensível a substâncias analgésicas de ação central e/ou periféricas, dotadas dos mais variados mecanismos de ação.

Foram utilizados camundongos Swiss, pesando entre 25-30 g (n=8), tratados com veículo – controle negativo, fração etanólica das cascas de *A. nitidum* (doses de 10, 30 e 100 mg/kg), ambos por via oral, e morfina – controle positivo (5 mg/kg; s.c.). Após 1 hora dos tratamentos por via oral e 30 minutos do grupo tratado via sub-cutânea, administrou-se, via i.p., aos animais o ácido acético 0,6% (10 mL/kg). O número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 minutos começados a contar à partir de 10 minutos da administração do ácido acético.

4.3.2. Ensaio de nociceção induzida por Formalina (Hunskar et al, 1987)

Neste modelo, a primeira fase começa imediatamente após a injeção e perdura por cerca de 5 minutos (Primeira Fase). Esta fase é seguida por um período de quiescência, de cerca de 5-10 minutos, após o qual desenvolve-se a segunda fase da resposta, que se inicia 15-20 minutos após a injeção e atinge o máximo aos 30-45 minutos.

As duas fases da resposta à formalina tem mediação química e mecanismos de modulação distintos, apresentando diferenças marcantes quanto a sua sensibilidade a drogas analgésicas. Assim é que a primeira fase é atribuído um caráter neurogênico, sendo sensível à analgésicos opióides e a alguns agonistas das vias descendentes, enquanto a segunda fase é melhor caracterizada como dor de origem inflamatória, sendo sensível à analgésicos anti-inflamatórios não-esteroidais.

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30g), em jejum de sólidos por 18h, postos para ambientação uma hora antes do teste. Os animais foram tratados como descrito anteriormente e após 1 hora dos tratamentos por via oral e 30 minutos do grupo tratado via sub-cutânea, a nociceção química foi induzida com uma injeção subplantar de formalina 1% (20µL/animal) na pata traseira direita e o tempo gasto, em segundos, pelo animal lambendo a pata, foi registrado durante os períodos de 0-5 minutos (primeira fase ou fase imediata da nociceção) e 20-30 minutos (segunda fase ou fase tardia, com liberação de mediadores químicos do processo inflamatório) após administração da formalina.

4.3.3. Ensaio da Placa Quente (Hot Plate Test) Eddy & Leimback, 1953

A colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50°C determinará uma resposta característica, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés (“sapateia”), levanta ou lambe uma das patas. A latência para o aparecimento desta resposta, cronometrado em segundos, pode ser considerada como indicativo da intensidade nociceptiva a um estímulo térmico. Este tipo de resposta é operante de integração central.

Os animais, camundongos Swiss (25-30 g), pré-selecionados 24 horas antes do teste, foram colocados, individualmente, numa placa quente de temperatura constante (55±0,5°C), com tempo de latência (“CUT off period”) de 20 segundos a fim de evitar lesões nas patas. Neste modelo foram utilizados 9 animais em cada grupo, devido ao grau de sensibilidade do teste. Foram utilizados os grupos: fração etanólica na concentração de 30 mg/kg da AN, via oral, pois foi a que demonstrou maior atividade nos experimentos já realizados, Controle negativo- Veículo, 1 ml/10 g, v.o. e Controle positivo- Morfina, 5 mg/kg, s.c. Foram observadas as respostas dos animais nos tempos 0 (antes da administração das substâncias testes), 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das drogas.

4.4. Atividade antiinflamatória

4.4.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina (WINTER *et al.*, 1962).

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz o aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória. O edema inflamatório induzido pela injeção de carragenina é resultante de ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios.

O edema de pata foi induzido em ratos Wistar, machos, 15-180g, (n=6 por grupo) pela injeção subplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. A pata contralateral recebeu o mesmo volume de salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo (3% de Tween 80 em salina 0,9%), fração etanólica de *A. nitidum* (100 mg/kg) e via subcutânea, indometacina (10 mg/kg). Após 1h dos tratamentos orais e 30 minutos do tratamento subcutâneo, os animais receberam a carragenina. O volume das patas foi registrado, em plesmomômetro (Ugo Basile®), antes da injeção

de carragenina e no intervalo de 1 h, 2 h, 3 h, 4 h e 5 h após a injeção. O edema é expresso pela diferença, em mililitros, entre a pata que recebeu carragenina e pata contralateral que recebeu salina.

4.4.2. Modelo de Inflamação crônica induzida por granuloma (“pellet”) de algodão (SWINGLE & SHIDEMAN, 1972).

O modelo de inflamação induzida por granuloma (“pellet”) de algodão é usado para mensurar a resposta ao processo inflamatório crônico, já que o teste é desenvolvido por sete dias, período no qual os mediadores inflamatórios da resposta inata são manifestados, bem como é estabelecido uma resposta mais prolongado ao alógeno.

Ratos Wistar, machos, 150-180 g, (n= 6 por grupo) foram anestesiados e tiveram seu dorso depilado e feita uma incisão no centro do dorso onde foram implantados, subcutaneamente, dois “pellets” de algodão esterilizados (~50 mg/cada), um de cada lado do dorso. Os animais foram tratados, via oral, com veículo, fração etanólica das cascas de *A. nitidum* (doses de 10, 30 e 100 mg/kg), e diclofenaco de sódio (10 mg/kg), uma vez ao dia, durante sete dias consecutivos. Ao final do oitavo dia, os animais foram sacrificados, os “pellets” de algodão retirados e determinado o peso úmido e o peso seco após secagem em estufa a 60 °C por 24 horas.

4.5. Atividade Antitérmica

4.5.1. Modelo de ação na resposta térmica induzida por *Saccharose cerevisiae* (Tomazetti et al. 2005).

A febre é um dos sintomas manifestos durante o processo inflamatório, na maioria dos casos, e é considerado como um sinal importante para o acompanhamento da resposta aos mediadores inflamatórios. Os modelos experimentais de piroxia têm grande importância para compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta febril, bem como para a triagem de compostos antipiréticos. O desenvolvimento da febre induzida por *Saccharose cerevisiae* acontece com o aumento concomitante da migração leucocitária para a região peritoneal.

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30g), n= 6/grupo, pesando entre 20-30 g, machos e fêmeas. Foram utilizados os grupos: Controle negativo- Veículo, 1 ml/10 g. via oral, fração etanólica de AN nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg, via oral. O estado febril nos animais foi induzido

através da injeção intraperitoneal da levedura *Saccharose cerevisiae* 50 mg/kg. A temperatura retal foi verificada, com termômetro digital, lubrificado, antes da administração das drogas testes e nos intervalos de 1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h após a administração das substâncias.

4.6. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos em média±E.P.M. A comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada através da análise de variância (ANOVA) uma via, seguida do teste de Student-Newman-Keul. Em todas as análises estatísticas, foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menor que 0,05 ($p<0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade antinociceptiva

5.1.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Foram contabilizadas as contorções dos animais, em cada grupo analisado, por um período de 20 minutos, após os 10 primeiros minutos da indução, onde ocorre uma estabilização na liberação de agentes endógenos nociceptores.

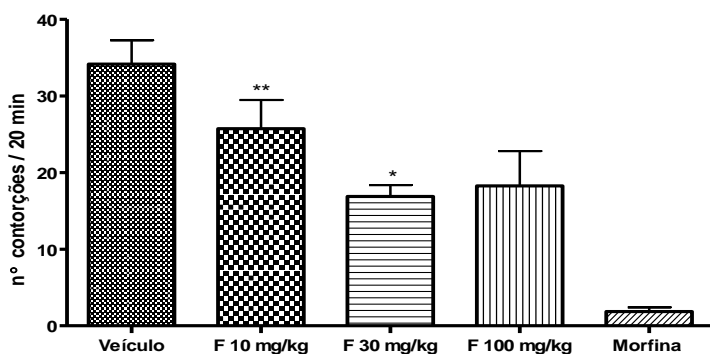


Fig. 2: Avaliação do efeito nociceptivo da fração etanólica de *A. nitidum*, no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs Salina. (ANOVA, seguida de teste de Student-Newman-Keul).

Na Fig. 2, observamos a relação entre as contorções abdominais produzidas nos animais dos grupos Veículo, Frações etanólicas e Morfina. Observou-se que o grupo tratado com solução salina teve maior número de contrações (conforme o esperado) e a morfina o menor número de contrações (também conforme o esperado). No caso das frações do extrato etanólico a fração que demonstrou ser mais eficaz foi a de 30mg/kg com diferença estatística significativa ($p,0,05$).

5.1.2. Ensaio de nociceção induzida por formalina.

Neste modelo, os resultados foram expressos em dois momentos: de 0 a 5 minutos após a indução da nociceção e de 20 a 30 minutos depois. Estas duas fases são características da resposta da formalina ao organismo do animal, que determina o aparecimento de respostas motoras bem caracterizadas que permite a avaliação da intensidade da resposta nociceptiva.

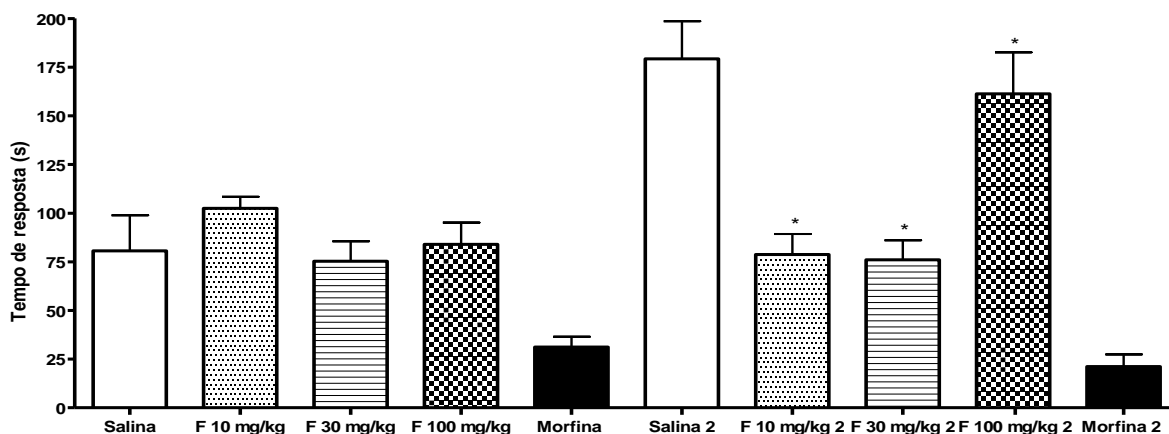


Fig. 3. Avaliação do efeito da fração etanólica de *A. nitidum*, no modelo de nociceção induzida por formalina. Fase 1: 0 a 5 min.; Fase 2: 20 a 30 min. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs Salina. (ANOVA, seguida de teste de Student-Newman-Keul).

Na análise comparativa, a fração etanólica de *A. nitidum*, não apresentou atividade antinociceptiva significativa na fase 1 desse modelo, demonstrando que sua ação não é mediada por resposta central, no entanto, AN apresentou atividade antinociceptiva significativa na fase 2 deste modelo, sugerindo uma possível ação antiinflamatória das concentrações de 10 e 30mg/kg.

5.1.3. Ensaio de nociceção no modelo da Placa Quente

A mensuração da resposta à sensação álgica por este modelo pode conferir um posicionamento mais amplo quanto ao tipo de resposta das drogas testadas.

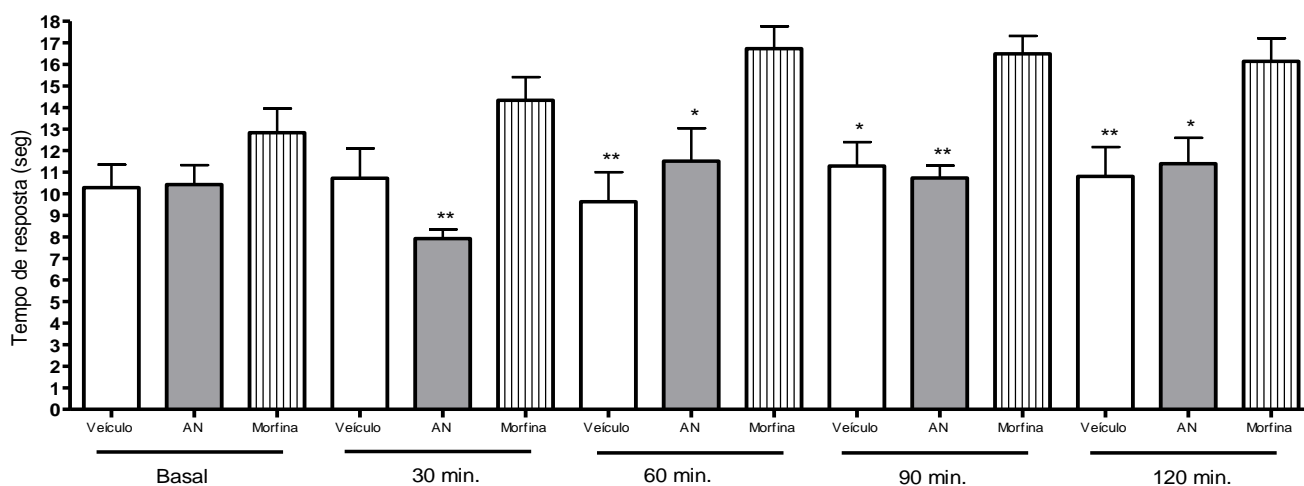


Fig. 4. Avaliação da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* (30 mg/kg, v.o.) na atividade antinociceptiva, no modelo da Placa Quente em camundongos Swiss. AN: 30 mg/kg; Morfina 5 mg/kg, v.o. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs Morfina. (ANOVA, seguida de teste de Student-Newman-Keul).

No experimento da Placa Quente, a fração testada de 30 mg/kg de *Aspidosperma nitidum* não apresentou diferença significativa estatisticamente em relação ao grupo controle positivo morfina, confirmando desta forma que a modulação da resposta antinociceptiva deste extrato não é mediada por resposta central, e que estes efeitos podem estar relacionados à ação antiinflamatória. Devido à estas respostas, os modelos a seguir podem elucidar esta teoria.

Os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram que a fração biologicamente ativa da *A. nitidum* apresentou efeito antinociceptivo nos modelos testados.

As contorções abdominais induzidas por ácido acético (Collier *et al*, 1968) foram melhor inibidas pela fração de 30 mg/kg de *A. nitidum*, esse modelo busca avaliar se a fração biologicamente ativa é capaz de inibir a dor de origem central e/ou periféricas dotadas dos mais variados mecanismos de ação. No modelo de nocicepção induzida por Formalina (Hunskar *et al*, 1987) as frações de 10 e 30 mg/kg apresentaram efeito na segunda fase da inflamação que é caracterizada pela dor de origem inflamatória o que demonstrar que nossa fração de *A. nitidum* tem características parecidas com analgésicos antiinflamatórios não esteroidais, porém no modelo Placa Quente (Hot Plate Test) Eddy & Leimback, 1953 a fração de 30 mg/kg de *A. nitidum* não demonstrou efeito estatisticamente significativo, o que nos leva a acreditar que o efeito inibidor da dor da fração ativa de *A. nitidum* não se dar pelo ação central.

5.2. Atividade antiinflamatória

5.2.1 Modelo de edema de pata induzido por carragenina.

A injeção intra-plantar de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada, sendo proporcional à intensidade da resposta inflamatória aguda e é resultante da ação sequencial e integrada de vários mediadores inflamatórios (histamina, serotonina, bradicinina, PAF, substância P e prostaglandinas). Este modelo é útil na avaliação da atividade antiinflamatória de novos compostos.

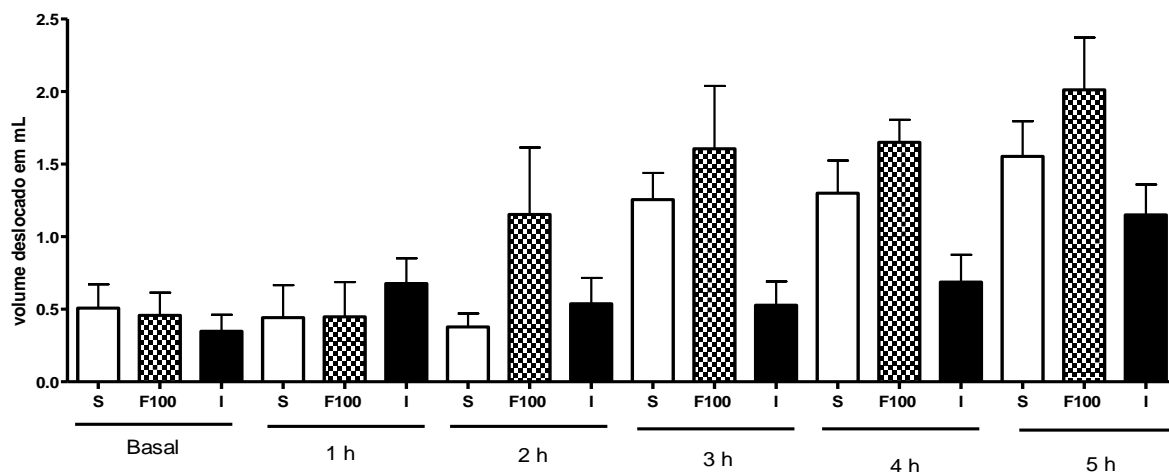


Fig. 5. Avaliação da atividade antiinflamatória da fração etanólica de *A. nitidum*, no modelo de edema de pata induzido por carragenina. S: salina; F100: fração etanólica de *A. nitidum* na concentração de 100 mg/kg; I: indometacina (10 mg/kg). * $p < 0,05$ vs Salina. (ANOVA, seguida de teste de Student-Newman-Keul).

Neste modelo, a dose estudada não foi eficaz na redução do edema, quando comparada com o controle positivo indometacina. No entanto, como os resultados dos experimentos anteriores demonstram efeito na dose de 30 mg/kg, não podemos descartar a possibilidade desta dose ser eficaz neste modelo, o que pode ser repetido para confirmação. Porém, esta análise nesta concentração não pode ser efetuada devido à falta de animais no Biotério Central.

5.2.2 Efeito na inflamação pelo granuloma induzido por “pellet” de algodão.

A inserção de um agente estranho no tecido superficial do animal é capaz de ativar a resposta inflamatória tanto a imediata quanto a tardia, permitindo o estudo dos efeitos em longo prazo de substâncias com propensa atividade antiinflamatória.

Neste modelo de resposta inflamatória crônica, as concentrações de 30 e 100mg/kg da fração etanólica de *A. nitidum* apresentaram significativa atividade anti-inflamatória em relação ao controle positivo.

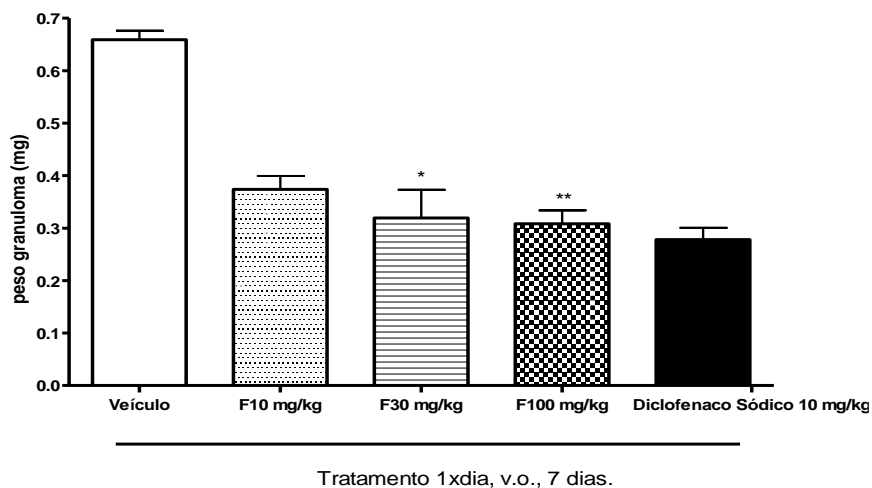


Fig. 6. Avaliação do efeito antiinflamatório da fração etanólica de *A. nitidum*, no granuloma induzido por “pellet” de algodão. F10, F30 e F100: fração etanólica de *A. nitidum* nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/kg, respectivamente. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs Salina. (ANOVA, seguida de teste de Student-Newman-Keul).

Os modelos que avaliaram a atividade antiinflamatória do extrato etanólico ativo de *A. nitidum*, nos permitiram definir que as concentrações de 30 e 100 mg/kg apresentaram significativa atividade antiinflamatória no modelo de inflamação crônica pelo granuloma induzido por “pellet” de algodão, sem terem sido reproduzidos no modelo agudo de inflamação – edema de pata, onde somente a concentração de 100 mg/kg foi testada, sem no entanto, desviar nossa visão para esta fase da inflamação, já que no modelo de nocicepção por formalina, AN apresentou resposta na fase secundária, onde há mediação de prostanóides e cininas, clássicos da modulação aguda da inflamação, a repetição do modelo com concentrações mais baixas pode elucidar esta ação.

5.3. Atividade Antitérmica

5.3.1. Efeito sobre a resposta térmica induzida por *Saccharose cerevisiae*.

No experimento da resposta térmica induzida por *Saccharose cerevisiae*, as frações de 30 mg/kg, 100 mg/kg e 300 mg/kg de *Aspidosperma nitidum* não apresentaram diferença significativa estatisticamente em relação ao grupo controle negativo solução salina, sugerindo-nos portanto que essas frações biologicamente ativas da *Aspidosperma nitidum* não possuem atividade antitérmica, na presença deste agente indutor, no entanto, para comprovação desta resposta propomos no futuro novo teste com outro agente pirético.

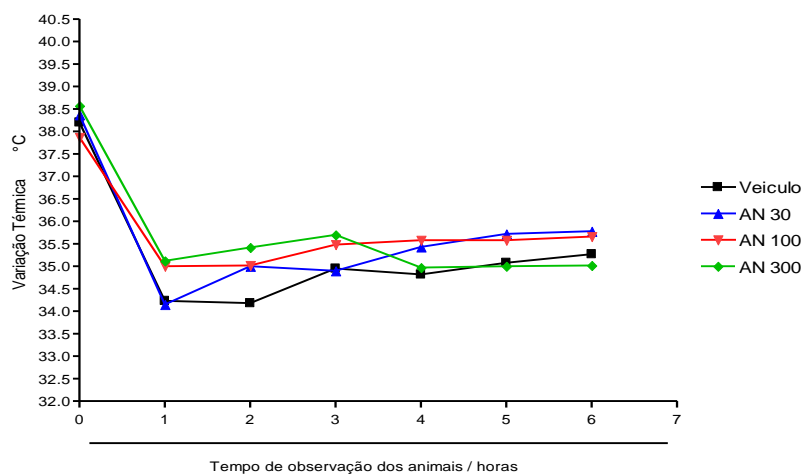


Fig. 7. Avaliação do efeito da fração etanólica de *A. nitidum* (AN), concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg no modelo de febre induzida por *Saccharomyces cerevisiae* em camundongos. Não houve diferença estatística – ANOVA, seguida de Teste de Tukey.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa podemos sugerir que a fração etanólica das cascas de *A. nitidum*:

Apresenta atividade antinociceptiva periférica e que seu mecanismo de ação pode ser mediada pela via das prostaglandinas;

Apresenta atividade antiinflamatória em processos crônicos sem descartamos sua resposta na inflamação aguda;

O estudo da dose eficaz pode apontar que as baixas concentrações sejam as mais eficazes para este fim;

Não apresentou atividade antitérmica significativa no modelos estudado, necessitando comprovações e novos métodos de estudo.

7. Referências Bibliográficas

BALBACH, A. **A Flora Nacional na Medicina Doméstica**. São Paulo: A Edificação do Lar, 1969.

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

CID, Pablo. **Plantas Mediciniais e Ervas Feiticeiras da Amazônia**. 1ed. São Paulo: Atlants Livros LTDA,1978.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. **Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol**

linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77-80, 2001.

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

LAPA, A. J, SOUCCAR, C., LIMA-LANDMAN, M. T. R., LIMA, T. C. M. **Métodos Farmacológicos para a Validação de Plantas Mediciniais**. São Paulo: CYTED/ CNPq, 2002.

MARTINS, E. R. *et al* **Buscando a saúde por meio das plantas medicinais**, em Plantas medicinais (UFC, Ed.), Viçosa, págs. 17-55, 2000

PEREIRA, M. M. *et al*. **Constituintes químicos e estudo biológico de *Aspidosperma nitidum* (Apocynaceae)**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.8, n.3, p.1-8, 2006.

PEREIRA, L. F., OLIVEIRA, C.I. F. B. **Estudo das atividades anti-inflamatória, analgésica e anticoncepcional dos extratos aquosos de *Aspidosperma carapanauba* (carapanaúba)**. Resumos do XIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, 16 a 20 de agosto de 2004, Manaus-AM. PIB-B/019/2003, 49p. Manaus, PROPESP – UFAM, 2004.

PINTO, A. C. SILVA, D. H. S. BOLZANI, V.S. LOPES, N. P. EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química nova**. V: 25, p: 45-61, 2002.

SCHULZ, V., *et al* **Plantas medicinais, fitomedicamentos e fitoterapia**, em Fitoterapia racional – um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. Mande, ed. Barueri, págs. 1-40, 2002

SOUZA, O. V. et al. **Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores**, 2007.

STASI, L.C. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002.

TOMAZETTI, J; *et al*. **Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening**. Journal of Neuroscience Methods, 2005.

Anexo

Tabela 1. Estudo da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na atividade antinociceptiva, no modelo Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos Swiss.

Grupos		Média±SEM
Veículo		34,14±3,12
Fração aquosa de AN	F 10 mg/kg	25,71±3,74
	F 30 mg/kg	16,88±1,48
	F 100 mg/kg	18,25±4,55
Morfina		1,86±0,55

Tabela 2. Estudo da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na atividade antinociceptiva, no modelo nocicepção induzida por Formalina em camundongos Swiss.

Grupos		Média±SEM	
		Fase 1	Fase 2
Veículo		80,67±18,21	179,3±19,29
Fração aquosa de AN	F 10 mg/kg	102,5±5,92	78,75±10,55
	F 30 mg/kg	75,25±10,31	76,00±10,06
	F 100 mg/kg	84,00±11,15	161,3±21,28
Morfina		31,20±5,32	21,17±6,28

Tabela 3. Estudo da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na atividade antinociceptiva, no modelo da Placa Quente em camundongos Swiss.

Grupo	Tempo de resposta (seg) M ± E.P.M.				
	Basal	30	60	90	120
Salina	10.28±1.073	10.72±1.386	9.629±3.646	11.29±1.107	10.81±1.364
Morfina 5 mg/kg	12.83±1.118	14.33±1.086	16.73±1.043	16.49±0.8276	16.14±1.069
AN 30 mg/kg	10.43±0.9019	7.924±0.4240	11.51±1.526	10.73±0.5811	11.40±1,199

Tabela 4. Estudo da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na atividade antiinflamatória, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar.

Grupos	Basal	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Veículo	0,51±0,16	0,44±0,22	0,37±0,09	1,25±0,18	1,30±0,22	1,55±0,24
F 100 mg/kg	0,45±0,15	0,44±0,23	1,15±0,45	1,60±0,43	1,65±0,15	2,01±0,36
Indometacina	0,34±0,11	0,67±0,17	0,53±0,17	0,52±0,16	0,68±0,18	1,15±0,20

Tabela 5. Estudo da ação de fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na atividade antiinflamatória, no modelo da inflamação pelo granuloma induzido por “pellet” de algodão em ratos Wistar.

Grupos	Média±SEM	
Veículo	0,66±0,01	
Fração aquosa de AN	F 10 mg/kg	0,37±0,02
	F 30 mg/kg	0,31±0,05
	F 100 mg/kg	0,30±0,02
Diclofenaco de Sódio 10 mg/kg	0,27±0,02	

Tabela 6. Estudo da ação da fração biologicamente ativa de *Aspidosperma nitidum* na febre induzida pela levedura *Saccharose cerevisiae* em camundongos Swiss.

Grupo	Temperatura °C						
	Basal	1	2	3	4	5	6
Veículo	38,20±0,19	34,23±0,22	34,18±0,35	34,95±0,29	34,82±0,18	35,08±0,26	35,27±0,32
AN 30 mg/kg	38,37±0,19	34,15±0,46	35,00±0,36	34,90±0,50	35,43±0,43	35,72±0,37	35,78±0,44
AN 100 mg/kg	37,87±0,26	35,00±0,47	35,02±0,50	35,48±0,56	35,58±0,62	35,58±0,48	35,66±0,49
AN 300 mg/kg	38,57±0,22	35,12±0,41	35,42±0,42	35,70±0,33	34,97±0,35	35,00±0,26	35,02±0,44