



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jaqueline Cibene Moreira Borges

**ACETILBERGENINA: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DAS  
ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**

BELÉM – PA  
2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jaqueline Cibene Moreira Borges

## **ACETILBERGENINA: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa

BELÉM – PA  
2010

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA**

---

Borges, Jaqueline Cibene Moreira.

Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória / Jaqueline Cibene Moreira Borges; orientador, Lourivaldo da Silva Santos, Co-orientador, Pergentino José da Cunha Sousa. — 2010

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2010.

1. Acetilbergenina. 2. Atividade anti-inflamatória. 3. Atividade antinociceptiva. 5. Bergenina. 6. *Endopleura uchi*. I. Título.

CDD - 22. ed. 615.1

---

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Jaqueline Cibene Moreira Borges

Acetilbergenina: Obtenção e Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Aprovado em:** 22/01/2010

### **Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos – UFPA

---

Prof. Dr. Adolfo Henrique Muller – CESUPA

---

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho – UNIFAP

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por toda proteção e saúde, por iluminar o meu caminho e por me presentear com mais uma conquista.

À minha família que sempre me acompanhou durante toda essa trajetória de estudos e de dedicação. Em especial aos meus pais, Urubatan Borges e Rosa Moreira Borges por serem fundamentais na minha vida!

E a todos os animais utilizados que foram essenciais para a realização deste trabalho. Dedico todo respeito e agradecimento.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Urubatan Borges e Rosa Moreira Borges, por ensinarem os verdadeiros valores da vida e por em todos os momentos estarem contribuindo, incentivando e lutando em cada fase de minha vida;

Aos meus irmãos, Franklin Moreira Borges e Jorge Wellington Moreira Borges, pela compreensão nos momentos especiais de nossas vidas em que estive ausente;

Aos meus sobrinhos, Camila, Jorge Júnior e Samanta e ao meu avô, Valentim, pelo carinho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos pelos constantes ensinamentos e orientações.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Pergentino José da Cunha pelo incentivo, competência e por todo o conhecimento que vem transmitindo de maneira tão paciente.

Ao Prof. Dr. José Carlos Tavares por permitir que alguns dos meus experimentos fossem desenvolvidos em seu laboratório de Fármacos na UNIFAP e à sua equipe de laboratório por toda ajuda e atenção.

Aos colegas de laboratório de Química da Faculdade de Química da UFPA e de Farmacodinâmica da Faculdade de Farmácia da UFPA, obrigada pela acolhida e pelas brilhantes colaborações oferecidas em momentos de incertezas;

Aos ensinamentos obtidos junto a cada um dos professores, quer diretamente em disciplinas cursadas do mestrado ou indiretamente com as pessoas e/ou trabalhos realizados;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo fornecimento dos animais utilizados nos testes farmacológicos.

## RESUMO

### ACETILBERGENINA: OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA

*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), uma planta da Amazônia brasileira, comumente conhecida como “uxi” é utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, como artrite. Bergenina, um dos constituintes químicos das cascas do caule de *E. uchi*, tem várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória e antinociceptiva. Visando a obtenção de um derivado mais potente que a bergenina decidiu-se acetilar esta substância. Acetilbergenina foi testada em modelos de nocicepção e de inflamação. Bergenina foi isolada a partir do fracionamento por cromatografia por via úmida do extrato aquoso das cascas do caule de *E. uchi* e acetilbergenina a partir da acetilação da bergenina. As substâncias foram identificadas com base na análise espectral de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT e COSY, e comparação com dados da literatura. Nos modelos de nocicepção foram realizados os testes de contorção abdominal, placa quente e formalina. Enquanto que nos modelos de inflamação foram realizados os testes dermatite induzida pelo óleo de cróton, edema de pata induzido por carragenina e dextrana e peritonite induzida por carragenina. Além disso, para avaliar o potencial ulcerogênico de acetilbergenina foi utilizado o modelo de úlcera gástrica induzida por estresse. No teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6%, acetilbergenina nas doses de 1, 5, 10, 15 e 25 mg/kg bloqueou o número de contorções abdominais em 28,2%, 52,7%, 61,1%, 68,3% e 95,0%, respectivamente, e de maneira dose-dependente quando comparada ao grupo controle. DE50 calculada foi de 6,8 mg/kg. No teste da placa quente (55 °C), acetilbergenina (6,8 mg/kg) não induziu alterações no tempo de latência quando comparada ao grupo controle. No teste da formalina, acetilbergenina (6,8 mg/kg) inibiu em 88,3% o estímulo álgico na 2ª fase (inflamatória) quando comparada ao grupo controle. Além disso, a naloxona reverteu o efeito de acetilbergenina nessa 2ª fase do teste. Na dermatite induzida por óleo de cróton, acetilbergenina (6,8 mg/kg) provocou efeito inibitório de 75,60% em relação ao grupo controle. No edema de pata induzido por carragenina, acetilbergenina (6,8 mg/kg) foi capaz de reduzir o desenvolvimento do

edema da 2<sup>a</sup> à 5<sup>a</sup> hora em comparação ao grupo controle. No edema de pata induzido por dextrana, acetilbergenina (6,8 mg/kg) reduziu o edema em todos os tempos. Na peritonite induzida por carragenina, acetilbergenina (6,8 mg/kg) bloqueou em 70% o número de neutrófilos quando comparada ao grupo controle. No ensaio de úlcera gástrica, acetilbergenina bloqueou em 78,55% a geração de lesões gástricas por estresse quando comparada ao grupo indometacina. Os resultados sugerem que acetilbergenina apresenta atividade antinociceptiva e atividade anti-inflamatória, provavelmente, de origem periférica.

**Palavras-chave:** Acetilbergenina; atividade anti-inflamatória; atividade antinociceptiva; bergenina; *Endopleura uchi*.



## ABSTRACT

### ACETYLBERGENIN: OBTAINMENT AND EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES.

*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae), a Brazilian Amazon plant, commonly known as “uxi”, is used in folk medicine for the treatment of several pathologies, such as arthritis. Bergenin, one of the chemical constituents of *E. uchi*, has several biological activities, including anti-inflammatory and antinociceptive activities. In order to obtain a more potent derivative than bergenin it has decided to acetyl this substance. Acetylbergenin was tested in nociception and inflammation models. Bergenin was isolated from the chromatographic fractionation of aqueous extract from stem bark of *E. uchi* and the acetylbergenin was obtained by acetylation of bergenin. The substances were identified based on spectral analysis of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT and COSY, and comparison with literature data. For nociception models were carried out the abdominal writhing test, hot plate test and formalin test, while in the inflammation models were carried out the croton oil-induced ear edema, rat paw edema induced by carrageenan and dextran, carragenin-induced peritonitis test. Furthermore, the model of gastric ulcer induced by stress was used to assess the potential ulcerogenic of the substance. In the abdominal writhing test induced by acetic acid 0.6%, acetilbergenin doses of 1, 5, 10, 15 and 25 mg / kg blocked the number of writhing in 28.2%, 52.7%, 61.1 %, 68.3% and 95.0%, respectively, and dose-dependent manner when compared to the control group. The calculated ED50 was 6.8mg/kg. In the hot plate test (55°C), acetylbergenin (6.8 mg/kg) did not induce alterations in the latency time when compared to the control group. In the formalin test, acetylbergenin (6.8mg/kg) inhibited 88.30% the algic stimulus in the second phase (inflammatory) compared to the control group. Furthermore, naloxone reversed the effect of acetylbergenin the second phase of this test. In the croton oil-induced dermatitis, acetylbergenin (6.8 mg/kg) provoked inhibitory effect in 75.60% in comparison to the control group. In the paw edema induced by carrageenan, acetylbergenin (6.8 mg/kg) was able to reduce the development of edema from the 2nd to the 5th hours compared to the control group. In the paw edema induced by dextran, acetylbergenin (6.8 mg/kg) reduced edema at all times. In carragenin-

induced peritonitis, acetylbergenin (6.8mg/kg) blocked 70% of the neutrophils number compared to the control group. In the trial of gastric ulcer, acetylbergenin blocked 78.55% in the generation of gastric lesions by stress when compared to indomethacin. The results suggest that acetylbergenin has an antinociceptive and anti-inflammatory activity which, according to the tests employed, is probably of peripheral origin.

**Keywords:** Acetylbergenin; anti-inflammatory activity; antinociceptive activity; bergenin; *Endopleura uchi*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fotografia da espécie <i>Endopleura uchi</i> .....	23
Figura 2- Fotografia da colheita do fruto de <i>Endopleura uchi</i> .....	24
Figura 3- Estruturas químicas das isocumarinas isoladas de <i>Endopleura uchi</i> .....	26
Figura 4- Estruturas químicas das substâncias análogas da bergenina.....	26
Figura 5- Estrutura química do derivado da bergenina.....	27
Figura 6- Fluxograma de obtenção do extrato aquoso liofilizado de <i>Endopleura uchi</i> .....	47
Figura 7- Fluxograma de obtenção da bergenina ( <b>S</b> <sub>1</sub> ) a partir do extrato aquoso liofilizado das cascas de <i>Endopleura uchi</i> .....	50
Figura 8- Reação de acetilação para obtenção de acetilbergenina.....	51
Figura 9- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e indometacina (5 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos.....	67
Figura 10- Determinação da DE <sub>50</sub> através da regressão linear do efeito da administração de acetilbergenina (1, 5, 10, 15 e 25 mg/kg, v.o.) sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% i.p. em camundongos.....	68
Figura 11- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e da morfina (10 mg/kg, s.c.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente à temperatura de 55 °C, em camundongos.....	69
Figura 12- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na primeira fase do teste.....	70
Figura 13- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na segunda fase do teste.....	71
Figura 14- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e indometacina (5 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por 3mL de carragenina (100 µL/pata) em ratos.....	72
Figura 15- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por dextrana (100 µL/pata) em ratos.....	73
Figura 16- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg v.o.) e dexametasona (0,5 mg/kg v.o.), sobre a migração de neutrófilos, para a cavidade peritoneal, induzida	

por carragenina (100 µg/mL) em ratos.....	74
Figura 17- Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg) e do ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/kg), sobre a dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos.....	75
Figura 18- Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de S <sub>1</sub> .....	103
Figura 19- Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de S <sub>1</sub> .....	104
Figura 20- Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de S <sub>1</sub> .....	105
Figura 21- Expansão do espectro de COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de S <sub>1</sub> .....	106
Figura 22- Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO) de S <sub>1</sub> .....	107
Figura 23- Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (75 MHz, DMSO) de S <sub>1</sub> .....	108
Figura 24- Espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	109
Figura 25- Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	110
Figura 26- Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	111
Figura 27- Espectro de COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	112
Figura 28- Expansão do espectro de COSY <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	113
Figura 29- Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	114
Figura 30- Expansão do Espectro de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	115
Figura 31- Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	116
Figura 32- Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT (75 MHz7, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Frações obtidas da CCVU do extrato aquoso liofilizado de <i>E. uchi.</i>	48
Tabela 2-	Dados de RMN <sup>1</sup> H (DMSO-d <sub>6</sub> , 300 MHz) de S <sub>1</sub> .....	62
Tabela 3-	Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ) de S <sub>1</sub> .....	63
Tabela 4-	Dados de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de S <sub>5</sub> .....	65
Tabela 5-	Dados de RMN <sup>13</sup> C (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de S <sub>5</sub> .....	66
Tabela 6-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos.....	119
Tabela 7-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o tempo de latência no teste da placa quente à temperatura de 55 °C, em camundongos.....	119
Tabela 8-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na primeira (0-5 min.) e na segunda (15-30 min.) fases do teste.....	120
Tabela 9-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (100 µL/pata) até 5 h, em ratos.....	120
Tabela 10-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de dextrana (100 µL/pata) até 120 min., em ratos.....	121
Tabela 11-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre a migração de neutrófilos, para a cavidade peritoneal, induzida por 3mL de carragenina (100 µg/mL) em ratos.....	121
Tabela 12-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre a dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos.....	122
Tabela 13-	Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), controle (solução de tween 2% + DMSO 2% em água destilada) e indometacina (10 mg/ kg, v.o), sobre a mucosa gástrica de ratos submetidos à restrição alimentar e estresse por imersão em água por 17h.....	76

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Plantas que contém bergenina e suas atividades biológicas.....	28
Quadro 2- Diferentes fontes naturais de bergenina.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	5-Hidroxitriptamina [serotonina]
<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anidrido acético
<b>AcOEt</b>	Acetato de etila
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Monofosfato cíclico de 3',5- adenosina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Bk</b>	Bradicinina
<b>CCDC</b>	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
<b>CCVU</b>	Cromatografia em Coluna Via Úmida
<b>COSY</b>	Correlated Spectroscopy
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenase 1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dose efetiva em 50% dos animais tratados
<b>DEPT</b>	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>Hex</b>	Hexano
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferon alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>

<b>LTE<sub>4</sub></b>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>NGF</b>	Fator de Crescimento Nervoso
<b>NMR</b>	Núcleo Magno da Rafe
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>NS</b>	Estatisticamente não significativa
<b>PAF</b>	Fator Ativador de Plaquetas
<b>PAG</b>	Substância Cinzenta Periaquedutal
<b>PBS</b>	Solução Tampão Fosfato
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina da série D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina da série E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2α</sub></b>	Prostaglandina da série F <sub>2</sub> alfa
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>Py</b>	Piridina anidra
<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup> H
<b>s.c.</b>	Via Subcutânea
<b>SG</b>	Substância gelatinosa
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecanoil-forbol-13-acetato
<b>v.o.</b>	Via Oral



## LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

$\mu$	Mu
$\mu\text{L}$	Microlitro
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dupleto
Hz	Hertz
k	kappa
kg	kilograma
<i>m</i>	Multiplete
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
ppm	Partes por Milhão
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
<i>tl</i>	Triplete largo
$\delta$	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20-21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	ASPECTOS BOTÂNICOS.....	22
	<b>2.1.1 Classificação Botânica.....</b>	22
	<b>2.1.2 Descrição da família Humiriaceae.....</b>	22
	<b>2.1.3 Descrição da espécie <i>Endopleura uchi</i>.....</b>	22-23
	<b>2.1.4 Distribuição.....</b>	24
	<b>2.1.5 Uso da espécie <i>Endopleura uchi</i>.....</b>	24
	2.1.5.1 Fruto.....	24
	2.1.5.2 Cascas.....	25
	2.1.5.3 Atividades biológicas relatadas.....	25
	<b>2.1.6 Constituintes químicos da <i>Endopleura uchi</i>.....</b>	25-27
	<b>2.1.7 Aspectos químicos e biológicos das substâncias estudadas neste trabalho.....</b>	27
	2.1.7.1 Bergenina.....	27
	2.1.7.1.1 Aspectos químicos.....	27
	2.1.7.1.2 Aspectos biológicos.....	28
	2.1.7.2 Bergenina acetilada.....	29
	<b>2.1.8 Distribuição da Bergenina.....</b>	29-30
2.2	INFLAMAÇÃO.....	31
	<b>2.2.1 Processo inflamatório.....</b>	31-32
	2.2.1.1 Serotonina.....	32
	2.2.1.2 Histamina.....	32-33
	2.2.1.3 Bradicinina.....	33
	2.2.1.4 Citocinas.....	33
	2.2.1.5 Fator de ativação plaquetária.....	34
	2.2.1.6 Óxido nítrico.....	34
	2.2.1.7 Eicosanóides.....	34
	2.2.1.7.1 <i>Leucotrienos</i> .....	35
	2.2.1.7.2 <i>Prostaglandinas</i> .....	35-36
	<b>2.2.2 Agentes anti-inflamatórios e seus mecanismos de ação.....</b>	36
	2.2.2.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais.....	36-38
	2.2.2.2 Anti-inflamatórios esteroidais.....	38
2.3	DOR.....	38
	<b>2.3.1 Definição de dor.....</b>	38-39
	<b>2.3.2 Classificação da dor.....</b>	39
	<b>2.3.3 Percepção da dor.....</b>	39-40
	<b>2.3.4 Teoria da Comporta.....</b>	41
	<b>2.3.5 Controle Central da Dor.....</b>	41-42
	<b>2.3.6 Agentes analgésicos e seus mecanismos de ação.....</b>	42
	2.3.6.1 Analgésicos não opióides.....	42
	2.3.6.2 Analgésicos opióides.....	42-44

<b>3 OBJETIVOS</b> .....	45
3.1 OBJETIVO GERAL.....	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	46
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	46
4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	46
<b>4.2.1 Caule</b> .....	46-47
4.3 FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS.....	47
<b>4.3.1 Fracionamento do Extrato Aquoso Liofilizado</b> .....	48
<b>4.3.2 Obtenção da Bergenina (S<sub>1</sub>)</b> .....	49-50
4.4 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DA BERGENINA.....	51
<b>4.4.1 Obtenção de Acetilbergenina (S<sub>5</sub>)</b> .....	51
4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ACETILBERGENINA.....	52
<b>4.5.1 Animais utilizados</b> .....	52
<b>4.5.2 Administração das drogas</b> .....	52
<b>4.5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva de acetilbergenina <i>in vivo</i></b> .....	53
4.5.3.1 Teste de contorções abdominais.....	53
4.5.3.2 Determinação da Dose Efetiva(DE <sub>50</sub> ).....	53
4.5.3.3 Teste da placa quente.....	53-54
4.5.3.4 Teste de Formalina.....	54
<b>4.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória de acetilbergenina <i>in vivo</i></b> .....	54
4.5.4.1 Edema de pata de rato por carragenina.....	54-55
4.5.4.2 Edema de pata de rato por dextrana.....	55
4.5.4.3 Peritonite induzida por carragenina.....	55-56
4.5.4.4 Dermatite induzida pelo óleo de cróton.....	56
4.6 TESTE PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA EM RELAÇÃO À LESÃO GÁSTRICA (lesões agudas induzidas por estresse).....	56-57
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
4.8 APARELHAGEM E MATERIAIS USADOS.....	58-59
4.9 DROGAS, SOLUÇÕES E SOLVENTES.....	59-60
<b>5 RESULTADOS</b> .....	61
5.1 IDENTIFICAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS.....	61
<b>5.1.1 Bergenina (S<sub>1</sub>)</b> .....	61-63
<b>5.1.2 Acetilbergenina (S<sub>5</sub>)</b> .....	64-66
5.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ACETILBERGENINA.....	67
<b>5.2.1 Avaliação da atividade antinociceptiva de acetilbergenina <i>in vivo</i></b> .....	67
5.2.1.1 Teste de contorções abdominais.....	67
5.2.1.2 Determinação da Dose Efetiva (DE <sub>50</sub> ).....	68
5.2.1.3 Teste da placa quente.....	69

5.2.1.4 Teste de formalina.....	70-71
<b>5.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória de acetilbergenina <i>in vivo</i></b> .....	72
5.2.2.1 Edema de pata de rato por carragenina.....	72
5.2.2.2 Edema de pata de rato por dextrana.....	73
5.2.2.3 Peritonite induzida por carragenina.....	74
5.2.2.4 Dermatite induzida pelo óleo de cróton.....	75
5.3 TESTE PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA EM RELAÇÃO À LESÃO GÁSTRICA (lesões agudas induzidas por estresse).....	76
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	77-90
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	91
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	92-101
<b>APÊNDICES</b> .....	102-122
<b>APÊNDICE A- Espectros</b> .....	102-117
<b>APÊNDICE B- Tabelas de dados farmacológicos</b> .....	118-122

## 1. INTRODUÇÃO

O homem moderno pode ser compreendido e diferenciado das demais épocas por seu consumo elevado de medicamentos. As pesquisas químicas e farmacêuticas ao longo do século XX possibilitaram o alívio para males que assolaram a humanidade por séculos, como a tuberculose, a sífilis e a hanseníase, assim como para as endemias do mundo moderno, como a depressão, as cardiopatias e a AIDS (VEIGA-JUNIOR, 2008). A grande oferta de medicamentos alopáticos, entretanto, não resolveu os problemas de saúde da maior parte da população. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da humanidade não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos (AKERELE, 1993).

Para essa população, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos. Se a população dos países mais pobres utiliza as plantas medicinais por tradição e ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitomedicamentos influenciado pelos modismos de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para males como a impotência, a ansiedade e a obesidade, algumas vezes em um único extrato. O conceito mais perigoso surgido por esta época foi o de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos de utilização pela população de todo o mundo (VEIGA-JUNIOR, 2008).

O potencial das plantas como fonte de novas drogas ainda oferece grande campo para investigação científica, pois das cerca de 250. 000 a 500. 000 espécies conhecidas, uma pequena porcentagem já foi investigada fitoquimicamente e apenas uma fração destas já foi avaliada quanto ao potencial farmacológico (RATES, 2001). Mesmo entre as plantas com uso medicinal tradicional ainda há um grande percentual que não foi objeto de estudo visando à comprovação da eficácia e da segurança de seu uso (RUIZ et al., 2008).

Dessa forma, é reconhecida a importância das plantas e seus derivados, no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de

drogas, não somente como matérias-primas para a síntese, mas também como modelos para compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2003). Segundo a OMS, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais. Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Portal da Secretaria da Agricultura, 2006).

A procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Diversas plantas da flora brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que dêem suporte científico ao seu uso na terapêutica (BRITO 1993 apud ARAGÃO, 2008).

A planta que foi selecionada neste trabalho é a espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas, família Humiriaceae, conhecida popularmente no Amazonas como: uxi amarelo, uxi-liso, uxi, uxi-pucu, e no Pará como: uxi-pucu e uxi (PRANCE; SILVA, 1975).

Recentemente foi realizado um estudo etnofarmacológico que apontou a utilização das cascas do uxizeiro no tratamento de inflamações. Ainda nesse trabalho foi realizado um estudo fitoquímico preliminar das cascas do caule de *Endopleura uchi* que levou ao isolamento e identificação da bergenina, como componente majoritário do extrato aquoso liofilizado (PINHEIRO; ROSARIO, 2006).

Essa substância, bergenina, apresenta diversas atividades biológicas, sendo que uma delas é a anti-inflamatória (SWARNALAKSHMI et al., 1984; NUNOMURA et al., 2009). Dessa forma, é provável que a mesma seja responsável pela atividade alegada pela medicina tradicional, como no tratamento de artrite. Assim, o isolamento de quantidades necessárias de bergenina para a obtenção do derivado, acetilbergenina, visando a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, é um caminho promissor para obtenção de propriedades biológicas mais potentes, pois estudos como de Lim et al. (2000b) constataram que acetilbergenina apresentou maior atividade hepatoprotetora quando comparado a bergenina, devido sua lipofilicidade mais elevada.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

#### 2.1.1 Classificação Botânica

- **Reino:** Plantae
- **Divisão:** Magnoliophyta
- **Classe:** Magnoliopsida
- **Sub-classe:** Magnoliidae
- **Ordem:** Malpighiales
- **Família:** Humiriaceae
- **Gênero:** *Endopleura*
- **Espécie:** *Endopleura uchi*

#### 2.1.2 Descrição da família Humiriaceae

*Humiriaceae* é uma família de plantas angiospérmicas (plantas com flor - divisão Magnoliophyta) que pertence à ordem Malpighiales. O grupo inclui 50 espécies de plantas constituída por 8 gêneros: *Duckesia*, *Endopleura*, *Hylocarpa*, *Humiria*, *Humirastrum*, *Sacoglottis*, *Shistostemon* e *Vantanea*. São espécies encontradas principalmente nas regiões neotropicais, ou seja, regiões tropicais das Américas. Dessa forma tem como distribuição geográfica: África tropical, México e Centroamérica, e América do Sul tropical. Suas espécies, árvores e arbustos, são plantas sempre-verdes. As flores são hermafroditas e os frutos são drupas, em geral com adaptações para dispersão pela água (GENTRY, 1993).

Neste trabalho foi estudado o gênero *Endopleura* que é monotípico. Sendo pertencente à espécie *uchi*.

#### 2.1.3 Descrição da espécie *Endopleura uchi*

A espécie *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. apresenta em sua nomenclatura científica, Cuatrec, sendo referente ao botânico espanhol José Cuatrecasas Arumí, que a descreveu inicialmente em 1961 (CUATRECASAS, 1961).

As várias denominações vulgares de *Endopleura uchi* (Huber), podem ser citadas: uxi-ordinário, uxi-verdadeiro, uxi-liso, axuá, cumatê, pururu. A espécie é

conhecida também como uxi-amarelo, uxi-liso, uxi, uxi-pucu, e no Pará como: uxi-pucu, uxi (PRANCE; SILVA, 1975). Além disso, tem como sinônimo botânico *Sacoglottis uchi* Huber.

O uxi (*Endopleura uchi*) é uma árvore alta, de tronco reto e liso, casca cinzenta, madeira de boa qualidade que atinge até 30 m de altura (Figura 1), em um diâmetro de até um metro, folhas denteadas e drupas comestíveis, com sementes oleaginosas e flores pequenas, brancas esverdeadas (SHANLEY; GAIA, 1998). O fruto é uma drupa com 7 cm de comprimento, verde-amarelado, com uma ou duas sementes. A polpa é farinácea e oleosa. A frutificação ocorre em junho a dezembro, e a propagação é por sementes (MARX et al., 2002). Mas em Manaus como em Belém, a árvore uxi ocasionalmente frutifica novamente na metade do verão, entre julho e agosto (SHANLEY; GAIA, 1998).

A *Endopleura uchi* é uma das espécies localmente valiosas que geram conflito de uso por causa da sua excelente madeira e de seus valores frutífero, medicinal e como atrativo para caça (SHANLEY; GAIA, 1998).



**Figura 1**- Fotografia da espécie *Endopleura uchi*. Fonte: BRAZILIAN WOODS. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/foreword.htm>>.



## 2.1.4 Distribuição

O uxizeiro é originário da Amazônia brasileira. É uma espécie tipicamente silvestre da mata alta de terra firme e ocorre por toda a Bacia Amazônica, desde o Peru até os Estados do Pará e Amazonas, mais freqüentemente no estuário do Pará e regiões Bragantina, Guamá; na parte ocidental do Marajó e nas regiões dos Furos (SHANLEY; MEDINA, 2004).

## 2.1.5 Uso da espécie *Endopleura uchi*

### 2.1.5.1 Fruto

O uxi como fruto é muito conhecido pela população amazônica, sendo muito valorizado atualmente no mercado (Figura 2), e utilizado para fazer picolé, sorvete, suco e óleo. A polpa do uxi é oleosa, de sabor e cheiro peculiares, muito agradáveis e é consumida no estado natural, pura ou com farinha de mandioca, constituindo um importante complemento na alimentação dessa população (CAVALCANTE, 1991). Utilizam-se também, a sua madeira para uso na marcenaria, e sua semente para o artesanato, defumação e amuleto (SHANLEY; GAIA, 1998).

O óleo do uxi é de muito boa qualidade, utilizado na comida e como remédio, além disso, é rico em fitoesteróis (1,4 g/100 gramas de óleo). A presença de fitoesteróis em alimentos reduz o nível de colesterol no sangue (SHANLEY; GAIA, 1998).



**Figura 2-** Fotografia da colheita do fruto de *Endopleura uchi*.  
Fonte: SHANLEY e GAIA, 1998.

#### 2.1.5.2 Cascas

A casca do caule do uxizeiro está sendo usada como chá (decoção), para reduzir ou eliminar miomas em mulheres. Sua casca é vendida como remédio para artrite, colesterol e diabetes (SHANLEY; GAIA, 1998).

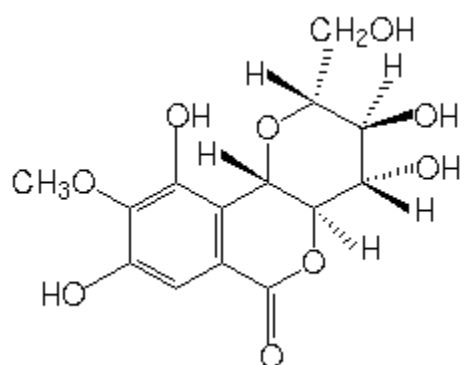
A casca da árvore de uxi ganhou mercado em 2001, quando feitas declarações na televisão sobre a eficácia para diabetes, colesterol e reumatismo. Esse crescimento rápido nas vendas por causa dos meios de comunicação modernos é particularmente notável, porque até essa informação ser veiculada na televisão, nenhum dos inúmeros vendedores e dos cem pequenos proprietários entrevistados para este estudo relatou o uso das cascas da árvore para fins medicinais (SHANLEY; GAIA, 1998).

#### 2.1.5.3 Atividades biológicas relatadas

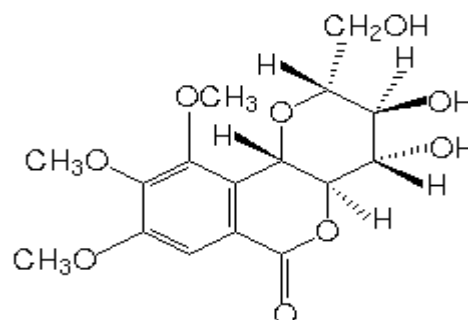
Os mais variados relatos de atividades biológicas demonstrado por esta espécie *Endopleura uchi*, justificam cada vez mais o crescente estudo por esta planta. Esta planta já demonstrou atividade anti-inflamatória (POLITI et al., 2007a), antimicrobiana (POLITI et al., 2007b; POLITI, 2009), e efeito na diminuição da motilidade intestinal (HUBINGER et al. 2007), além de apresentar atividade imunológica (MOREIRA et al., 2007).

#### 2.1.6 Constituintes químicos de *Endopleura uchi*

Estudos fitoquímicos com essa espécie levaram ao isolamento de isocumarinas bergenina (**S<sub>1</sub>**) e 8,10 dimetoxibergenina (**S<sub>2</sub>**) (Figura 3), além de terem descrito a ocorrência de triterpenóides pentacíclicos, ácido masílinico e o seu éster masilinato de metila a partir do caule (LUNA et al., 2000). Além desses constituintes químicos, a caracterização do extrato aquoso liofilizado das cascas de *Endopleura uchi*, revelou a presença de açúcares redutores, glicosídeos cardíacos, purina, lactonas sesquiterpênicas e outras lactonas e taninos (PINHEIRO; ROSARIO, 2006; POLITI, 2009).



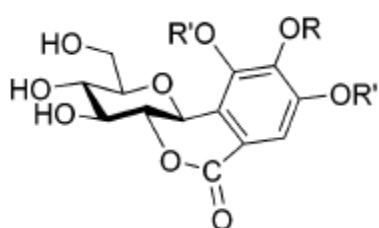
**(S<sub>1</sub>) Bergenina**



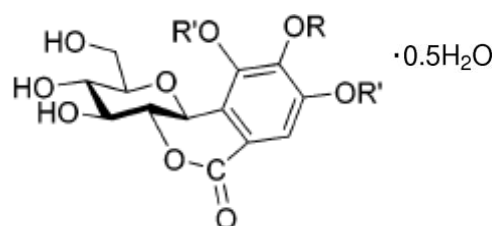
**(S<sub>2</sub>) 8,10 Dimetoxibergenina**

**Figura 3-** Estruturas químicas das isocumarinas isoladas de *Endopleura uchi*

Também foi descrita na literatura, análogos da bergenina, como norbergenina (**S<sub>3</sub>**) e desmetilbergenina hemihidratada (**S<sub>4</sub>**) (Figura 4) que são derivados do ácido gálico C-glicosídeos e foram isolados a partir de uma variedade de plantas (ZAMARRUD et al., 2006; RAMAIAH et al., 1979; HERZNER et al., 2002).



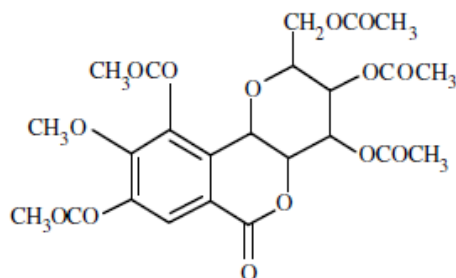
**(S<sub>3</sub>) Norbergenina: R = R' = H**



**(S<sub>4</sub>) desmetilbergenina hemihidratada**

**Figura 4-** Estruturas químicas das substâncias análogas da bergenina

Nosso estudo foi realizado também com as cascas do caule de *Endopleura uchi*, de onde foi isolada a bergenina (**S<sub>1</sub>**) e a partir desta foi obtido o derivado, acetilbergenina (**S<sub>5</sub>**) (Figura 5).



(**S<sub>5</sub>**) Acetilbergenina

Figura 5- Estrutura química do derivado da bergenina.

## 2.1.7 Aspectos químicos e biológicos das substâncias estudadas neste trabalho

### 2.1.7.1 Bergenina

#### 2.1.7.1.1 Aspectos químicos

A estrutura da bergenina proposta por Tschitschibabin et al., (1928) foi alterada em 1950 por Shimokoriyama e revista independentemente por Hay e Haynes (1958) e Posternak e Dür (1958). A bergenina tem demonstrado ser uma lactona (éster cíclico) de  $\beta$ -D-glucopiranosil-4-O-ácido metil gálico (HAY; HAYNES, 1958).

Mais tarde verificou-se que a bergenina é um (4-metoxi-2[tetrahydro-3,4,5-trihidroxi-6 (hidroximetil) piran-2-il ]- $\alpha$  resocíclico ácido  $\delta$  -lactona) (ABE et al., 1979). Um C-glucosídio de ácido 4-O-metilgálico (POSTERNAK; DÜRR, 1958).

A molécula da bergenina é composta de três anéis de seis membros: um anel aromático, um anel glucopiranosose e um anel  $\delta$ -lactona. O anel glucopiranosose exhibe apenas pequenos desvios a partir de uma conformação ideal do tipo cadeira. O anel  $\delta$ -lactona possui a esperada conformação semi-cadeira (YE et al., 2004; RASTOGI et al., 2008).

Por se tratar de um composto instável, especialmente em temperatura ambiente e presença de luz, sua vida útil depende principalmente das condições de armazenamento (QIN et al., 2007).

#### 2.1.7.1.2 Aspectos biológicos

Experimentos farmacológicos têm indicado que possui significativa atividade antiasmática, antitussígena, anti-inflamatória, antifúngica (PRITHIVIRAJ et al., 1997), anti-HIV (PIACENTE et al., 1996) e atividade hepatoprotetora (KIM et al., 2000; LIM et al., 2000c). Além disso, a bergenina tem sido usada no Japão para o tratamento de doenças gastrintestinais, como úlcera gástrica, diarreia e constipação (ABE et al., 1980). O resumo das atividades biológicas já comprovadas da bergenina encontra-se no Quadro 1.

FAMÍLIA	ESPÉCIE	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
Euphorbiaceae	<i>Mallotus japonicus</i>	Neuroprotetora	TAKAHASHI et al., 2003.
		Antihepatotóxica	KIM et al., 2000.
		Contra Gastrite e úlcera	ABE et al., 1980.
	<i>Flueggea microcarpa</i>	Hipolipidêmico	JAHROMI et al., 1992
		Antifúngica	PRITHIVIRAJ et al., 1997.
	<i>Flueggea virosa</i>	Antiarritmica	PU et al., 2002.
Tripanocida		NYASSE et al., 2004.	
Fabaceae	<i>Peltophorum africanum</i>	Anti-HIV	BESSONG et al., 2005.
Humiriaceae	<i>Sacoglottis gabonensis</i>	Antioxidante	MADUKA et al., 2006.
	<i>Endopleura uchi</i>	Antimicrobiana	SILVA et al., 2009.
Leguminosae	<i>Caesalpinia digyna</i>	Anti-inflamatória	NUNOMORA et al., 2009
		Antioxidante	SRINIVASAN et al., 2007.
	<i>Peltophorum pterocarpum</i>	Antioxidante	SWARNALAKSHMI et al., 1984.
Myrsinaceae	<i>Ardisia japonica</i>	Antidiabética/ antiobesidade	LI et al., 2005.
		Antiviral contra hepatite C	PIACENTE et al., 1996.
Saxifragaceae	<i>Bergenia stracheyi</i>	Anti-artrite	NAZIR et al., 2007
	<i>Saxifraga stolonifera</i>	Anticâncer	CHEN et al., 2008b.
	<i>Astilbe thunbergii</i>	Curativo em queimaduras	KIMURA et al., 2007

**Quadro 1** - Plantas que contém bergenina e suas atividades biológicas.

### 2.1.7.2 Bergenina Acetilada

A acetilbergenina foi sintetizada pelo método de Tamaiha e colaboradores a partir da bergenina isolada do córtex de *M. japonicus* (KIM et al., 2000) e sua estrutura confirmada por comparação das propriedades físico-químicas e por dados espectrais como UV e RMN (LIM et al., 2000b).

A bergenina acetilada tem mostrado um efeito hepatoprotetor em experimentos com animais. Além disso, a sua síntese a partir da acetilação da bergenina isolada de *Mallotus japonicus* promoveu aumento da lipoficidade e conseqüentemente das atividades biológicas (LIM et al., 2000b).

Estudos *in vitro* demonstraram que os efeitos hepatoprotetores da bergenina, apresentaram maior atividade em relação à acetilbergenina. Entretanto quando realizados *in vivo*, a acetilbergenina mostrou maior atividade (LIM et al., 2000b).

### 2.1.8 Distribuição da Bergenina

Bergenina foi isolada das raízes de *Bergenia crassifolia* (1998), *B. purpurascens* e *Casesalpinia digyna*, a partir da casca de *Corylipsis spicata* e *Mallotus japonicus* (1982), a partir do cerne de *Shorea leprosula* e *Macaranga peltatathe* (1979) e, a partir do rizoma de *Astilbe chinensis* (2002) (HAY; HAYNES, 1958; YE et al., 2004; QUIN et al., 2007). Mas a bergenina têm sido mais abundantemente relatada em gêneros pertencentes à família Euphorbiaceae, Saxifragaceae e Myrsinaceae. Está presente principalmente em *Ardisia* sp. e *Mallotus* sp. Além de outras famílias de plantas (RASTOGI; KAWAT, 2008) (Quadro 2). Também merece destaque a relação de espécies em que se isolou a bergenina e se avaliou as suas propriedades biológicas (Quadro 1).

<b>FAMÍLIA</b>	<b>NOME DA PLANTA</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
Saxifragaceae	<i>Astilbe chinensis</i>	CHEN et al., 2004; SUN et al., 2002; CHEN et al., 1988.
	<i>Astilbe thunbergii</i>	HAN et al., 1998; KIMURA et al., 2007.
	<i>Bergenia ligulata</i> (wall.) engl.	CHAUHAN et al., 2002.
	<i>Bergenia purpurascens</i> engl.	CHEN et al., 1988; XIN-MIN et al., 1987.
	<i>Bergenia stracheyi</i> (Hook. f. & thomson) engl.	NAZIR et al., 2007.
	<i>Boykinia lycoctonifolia</i> engl.	IZAWA et al., 1973.
	<i>Peltoboykinia watanabei</i> (Yatabe) Hara	IZAWA et al., 1973.
	<i>Saxifraga stolonifera</i> w. curtis	TANEYAMA et al., 1983.
	<i>Saxifraga melanocentra</i> Franch.	ZUO et al., 2005.
Euphorbiaceae	<i>Flueggea virosa</i> (willd.) voigt	NAYASSE et al., 2004; PU, 2002.
	<i>Flogged microcarpa</i> Blume	GOEL et al., 1997; AHMAD et al., 1972.
	<i>Mallotus japonicus</i> Müll. Arg.	HANG et al., 2003; SAIJO 1990; YOSHIDA et al., 1982; TAKAHASHI et al., 2003; LIM et al., 2001a; LIM et al., 2001b.
	<i>Mallotus repandus</i> (Rottler) Müll. Arg.	TOMIZA et al., 1976.
	<i>Securinega melanthesoides</i> (F. Muell.) Airy Shaw	SCHUTZ et al., 1998.
Myrsinaceae	<i>Ardisia crenata</i> Sims	HAN et al., 1989; NI et al., 1988
	<i>Ardisia japonica</i> Blume	LI et al., 2005; PIANCENTE et al., 1996; LIU, W., 1991.
	<i>Ardisia pusilla</i> A. Dc.	KOBAYASHI, 2005
Dipterocarpaceae	<i>Vateria indica</i> c.F. Gaertn.	MISHIM et al., 2003; ITO et al., 2003a.
	<i>Vatica pauciflora</i> Blume.	ITO et al., 2003b.
	<i>Hopea utilis</i> (Bedd.) Bole	TANAKA et al., 2001.
Humiriaceae	<i>Sacoglottis gabonensis</i> Urb.	OGAN, 1971.
Crassulaceae	<i>Crassula</i> l cv. 'Himaturi'	LEE et al., 2005.
	<i>Rhodiola kirilowii</i> (Reg.) Reg	ZHANG et al., 1991.
Fabaceae	<i>Peltophorum africanum</i> Sond.	BESSONG et al., 2005; MEBE et al., 1992.
Sapindaceae	<i>Allophylus edulis</i> var. <i>edulis</i>	HOFFMANN et al., 1992.
	<i>Allophylus edulis</i> var. <i>gracilis</i>	HOFFMANN et al., 1992.
Leguminosae	<i>Pentaclethra macrophylla</i> Benth.	GABRIEL et al., 2005.
	<i>Caesalpinia digyna</i> Rottl.	SRINIVASAN et al., 2007.
Connaraceae	<i>Connarus monocarpus</i>	AIYAR et al., 1964.
Moraceae	<i>Ficus racemosa</i> L.	LI et al., 2004.
Lythraceae	<i>Woodfordia fruticosa</i>	OKADA et al., 1973.

**Quadro 2-** Diferentes fontes naturais de bergenia. Fonte: RASTOGI e KAWAT (2008).

## 2.2 INFLAMAÇÃO

### 2.2.1 Processo inflamatório

A inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo, uma vez que sua principal função é eliminar a infecção ou reparar os danos e assim retornar ao estado de homeostase (BARTON, 2008).

Na resposta de fase aguda, que ocorre logo após a agressão, há aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, com recrutamento de leucócitos no foco da lesão e liberação de mediadores inflamatórios. A transição para a fase crônica é caracterizada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular. Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica, com frequência, começa de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática (GERALDO; ALFENA, 2008).

Durante o processo inflamatório ocorre a interação de vários mediadores que, agindo em conjunto, induzem modificações morfológicas e funcionais peculiares ao processo, tais como eritema, rubor, edema, dor ocorrendo perda de função celular ou estrutural (ALENCAR; ROCHA; PINHEIRO, 2005; BALBINO et al., 2005). Esses mediadores pró-inflamatórios são tanto de origem tissular, por exemplo, os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, aminas vasoativas (histamina e serotonina), citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF e IFN- $\alpha$ ), óxido nítrico, como de origem plasmática, os componentes do sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (RYAN; MAJNO, 1977; FEGHALI; WRIGHT, 1997; CARVALHO et al., 2004).

A fase vascular caracteriza-se, inicialmente, por dilatação arteriolar, especialmente desencadeada via PGI, PGD<sub>2</sub> e PDE<sub>2</sub>, que por sua vez proporciona aumento do fluxo de sangue, seguido de estase sanguínea, aumento na permeabilidade venular pós-capilar e, por último, exsudação plasmática, carreando para os tecidos componentes dos sistemas complemento, da coagulação, fibrinolítico e das cininas. Concomitante, ocorre a ativação dos eventos celulares com a participação efetiva das células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), mononucleares (monócitos, macrófagos e linfócitos), mastócitos e seus



respectivos mediadores pró-inflamatórios (ALENCAR; ROCHA; PINHEIRO, 2005; RANG et al., 2007).

Quando, inicialmente, esses mediadores são liberados no local onde se deflagrou o processo, os macrófagos locais sinalizam a presença de material estranho ou lesão através destes mediadores e/ou citocinas que apresentam um papel amplificador no processo e cuja finalidade é de recrutar células circulantes (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, eosinófilos, linfócitos) (ARAÚJO, 2007). Entre as substâncias que podem manter e amplificar os diversos processos inflamatórios segue-se exemplos de algumas: serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas, citocinas, óxido nítrico e fator de ativação plaquetária (PAF).

#### 2.2.1.1 Serotonina

Serotonina, uma amina vasoativa, é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, uma vez que tem sido implicada, como um mediador inflamatório na fase inicial do aumento da permeabilidade vascular em certas respostas inflamatórias em camundongos e ratos (RYAN; MAJNO, 1977).

#### 2.2.1.2 Histamina

A histamina é um dos mediadores mais precocemente liberados durante o processo inflamatório. Encontra-se estocada principalmente nos mastócitos e basófilos e sua concentração é particularmente elevada onde contém grande número de mastócitos, como a pele, a mucosa da árvore brônquica e mucosa intestinal (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; WHITE, 1999; BRUTON; LAZO; PARKER, 2006).

No processo inflamatório a histamina é liberada pela degranulação dos mastócitos promovida por diversos estímulos, incluindo a substância P, interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento nervoso (NGF). Além disso, desempenha um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas (BRUTON; LAZO; PARKER, 2006). Uma vez liberada a histamina pode agir em receptores H<sub>1</sub> e H<sub>2</sub>, produzindo vasodilatação em arteríolas e vênulas, aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento de líquido e proteínas para os tecidos

perivasculares e formação de edema, componentes essenciais na formação e cronificação do processo inflamatório (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

#### 2.2.1.3 Bradicinina

A bradicinina (Bk) é um cininogênio vasoativo de alto peso molecular, sendo descrita como ativadora direta dos nociceptores e mediadora hiperalgésica. A Bk liga-se a quatro tipos de receptores conhecidos (Bk<sub>1</sub>-Bk<sub>4</sub>), sendo que Bk<sub>1</sub> e Bk<sub>2</sub> parecem ser os mais importantes com relação à dor de natureza inflamatória. A Bk apresenta um potente efeito sobre a permeabilidade vascular, com efeitos semelhantes aos da histamina. É também um importante mediador no que se refere à resposta inflamatória tecidual como estímulos irritantes, porém sua ação é curta devido a rápida degradação enzimática (MILLAN, 1999; ARAÚJO, 2007).

#### 2.2.1.4 Citocinas

As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas de baixo peso molecular, extremamente potentes, que iniciam sua ação através da ligação a receptores específicos, provocando alteração da síntese do RNA e de proteínas de diferentes células do organismo. Podem agir no local onde são produzidas, em células próximas ou são secretadas para circulação, com efeitos à distância (KRAYCHETE et al., 2006).

As citocinas mais importantes são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF). A IL-1 e o TNF são liberados por macrófagos mononucleares durante o processo inflamatório e produzem muitas das respostas pro-inflamatórias, incluindo indução de febre, mobilização e ativação de leucócitos polimorfonucleares, indução das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase, elevação na expressão de moléculas de adesão, ativação de linfócitos T e B e estimulação da produção de outras citocinas (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Além disso, a sinalização desregular de IL-6 contribui para o aparecimento e manutenção de diversas doenças, como artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, osteoporose, esclerose múltipla e vários tipos de câncer (HEINRICH et al., 2003; SOMMER; KRESS, 2004).

#### 2.2.1.5 Fator de ativação plaquetária

O fator de ativação plaquetária (PAF) é um potente mediador inflamatório fosfolipídico que aumenta a adesão celular e ativa as células endoteliais por efeito direto ou através da formação de radicais tóxicos de oxigênio ou metabólitos do ácido araquidônico. É liberado pelos macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, plaquetas e células endoteliais (SALLES et al., 1999). Além disso, o PAF ativa outros leucócitos envolvidos na inflamação, tais como monócitos (PRESCOTT et al., 2000).

#### 2.2.1.6 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) está normalmente presente tanto no coração como na parede dos vasos, e apresenta papel fisiológico, sendo gerado pela enzima, denominada NO sintase (NOS) constitutiva (SALLES et al., 1999). NO é considerado uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias. O NO antagoniza as contrações da musculatura lisa vascular e inibe a ativação plaquetária. Atuando nas integrinas, o NO modifica a adesividade leucocitária e a diapedese dos neutrófilos (SALLES et al., 1999; FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

A NOS é induzida por citocinas pro-inflamatórias, resultando em aumento na produção de NO que pode aumentar exsudação de sangue e plasma, como observado na asma e outras doenças inflamatórias e ampliar a resposta inflamatória, como um agente quimiotático para eosinófilos e para o aumento da sobrevivência dos mesmos (BARNES, 1998).

#### 2.2.1.7 Eicosanóides

Os compostos da família das prostaglandinas e dos leucotrienos são denominados de eicosanóides, em virtude de serem derivados de ácidos graxos essenciais de vinte carbonos esterificados em fosfolipídios da membrana celular. A fosfolipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) hidrolisa fosfolipídios de membrana, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando o ácido araquidônico (AA). O AA liberado servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das ciclooxigenases (COX), que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos, lipoxinas e outros compostos (CARVALHO et al., 2004).

### *2.2.1.7.1 Leucotrienos*

Os leucotrienos são importantes mediadores químicos em uma variedade de condições inflamatórias e alérgicas. Estas moléculas de sinalização podem ser divididas em dois grupos: o leucotrieno pró-inflamatório (LTB<sub>4</sub>) e leucotrienos espasmogênicos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>). Entre os leucotrienos, geralmente o LTE<sub>4</sub> é menos potente do que LTC<sub>4</sub> e LTD<sub>4</sub>. Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de grande variedade de efeitos, incluindo principalmente a contratilidade da musculatura lisa (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>); agregação, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos (LTB<sub>4</sub>); aumento na permeabilidade vascular (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>); atividade sobre linfócitos e hiperalgesia (LTB<sub>4</sub>) (HAEGGSTRÖM, 2000).

O perfil das propriedades biológicas de LTB<sub>4</sub> torna-o um componente-chave na complexa rede de células solúveis e fatores vinculados que governam o desenvolvimento e a manutenção da inflamação, pois o LTB<sub>4</sub> parece desempenhar um papel fundamental no recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão tecidual (HAEGGSTRÖM, 2000), e pode causar exsudação de plasma, exigindo a presença de leucócitos polimorfonucleares. Estas ações têm implicado os leucotrienos em atuarem como mediadores na asma, reações hipersensibilidade imediata, reações inflamatórias e infarto do miocárdio (DAVIES et al., 1984; NEEDLEMAN, et al., 1986).

### *2.2.1.7.2 Prostaglandinas*

A síntese das prostaglandinas inicia-se, portanto, com a atividade da ciclooxigenase catalisando a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH<sub>2</sub>. As PGG e PGH apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos ativos, incluindo PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TX) (CARVALHO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2008).

Na maioria dos leitos vasculares as prostaglandinas da família E (PGEs) são potentes vasodilatadoras. A PGI<sub>2</sub> é sintetizada pelo endotélio vascular, controlando a adesão de células ao endotélio e a agregação plaquetária, contribuindo como mecanismo antitrombogênico da parede vascular intacta. As prostaglandinas da série E e I são potentes vasodilatadores e como tal, podem aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa, e conseqüentemente aumentar a resistência da mucosa gástrica à lesão. Além disso, os efeitos vasodilatadores das prostaglandinas facilitam a restituição epitelial, contribuindo para a circulação de um pH elevado no microambiente mucóide que se forma como um tampão sobre os sítios que sofreram dano epitelial (CARVALHO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2008; WALLACE, 2008).

## **2.2.2 Agentes anti-inflamatórios e seus mecanismos de ação**

### **2.2.2.1 Anti-inflamatórios não-esteroidais**

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são utilizados para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, tais como artrite reumatóide. O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da COX e conseqüente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (MONTEIRO et al., 2008).

A aspirina e os demais AINEs inibem a síntese de PG mediante a inativação da COX. A aspirina acetila as isoenzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2) covalentemente, inativando-as de forma irreversível e não seletiva. Em contraste, os AINEs, como ibuprofeno ou indometacina inibem a COX reversivelmente competindo com o substrato, ácido araquidônico, para o sítio ativo da enzima. A maioria dos AINEs age de forma reversível e não seletiva sobre as mesmas enzimas. Convém salientar que tanto a aspirina quanto os outros AINEs não bloqueiam a via da lipoxigenase; não inibindo, desta forma, a produção de leucotrienos (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998; MONTEIRO et al., 2008).

Infelizmente, a inibição da produção de PG em órgãos como estômago e rim pode resultar em lesões gástricas, nefrotoxicidade e aumento de hemorragias (MASFERRER et al., 1994; FABIOLA et al., 2001; RAJAKARIAR et al., 2006). Todos AINEs convencionais têm a tendência de causar efeitos adversos gastrointestinais que podem variar de dispepsia a sangramentos de estômago e duodeno, ativar doenças inflamatórias intestinais quiescentes e causar dano tecidual (como úlceras)

no trato gastrointestinal baixo, geralmente, após um longo período de uso. Muitos AINEs são derivados do ácido carboxílico e se encontram na forma não ionizada no lúmen gástrico e, dessa maneira, podem ser absorvidos pela mucosa gástrica. Com a mudança de pH ácido para neutro, no interior da mucosa, a droga ionizada é armazenada temporariamente no interior das células epiteliais, o que causa dano às mesmas. Entretanto, esse dano “tópico” não parece ser de fundamental importância para a patogênese da sintomatologia ulcerosa. Essa última se deve principalmente a uma consequência da inibição sistêmica da atividade COX-1 da mucosa gastrointestinal (GI) (MONTEIRO et al., 2008).

Mesmo com administração intramuscular ou intravenosa de aspirina ou outros AINEs pode causar úlceras gástricas ou duodenais. Por inibirem a COX-1, os AINEs impedem a síntese de prostaglandinas gástricas, especialmente PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>, que servem como agentes citoprotetores da mucosa gástrica. Estes eicosanóides agem inibindo a secreção ácida pelo estômago, aumentando o fluxo sangüíneo na mucosa gástrica e promovendo a secreção de mucocitoprotetor. A inibição da sua síntese, portanto, acarreta ao estômago uma maior suscetibilidade às lesões; cujo aspecto característico, com infiltrado inflamatório, levou ao uso da denominação de gastropatia por AINE. Além disso, diminui a adesividade plaquetária, aumentando os riscos de sangramento. A indometacina, por exemplo, apresenta acentuada recirculação enteropática, o que aumenta os efeitos tóxicos deste fármaco (BRENOL et al., 2000).

Os AINEs induzem úlcera hemorrágica provavelmente, aos efeitos dessas drogas sobre as plaquetas. A produção de tromboxano pelas plaquetas é um potente estímulo para agregação plaquetária e um potente vasoconstritor. A liberação de tromboxano é desencadeada durante o processo de coagulação, e sua síntese ocorre através da COX-1. AINEs que inibem a COX-1 pode, portanto, suprimir a síntese de tromboxano das plaquetas e assim reduzir a capacidade de agregação de plaquetas, ou seja, a administração de AINEs pode provoca uma breve interrupção do fluxo sangüíneo da mucosa, resultando numa rápida transformação do ferimento superficial em danos hemorrágicos de forma a penetrar em toda a espessura da mucosa (WALLACE, 2008).

Desta forma, com a descoberta da COX-2 e da crença original de que é expressa apenas nos locais de inflamação levantou-se a possibilidade de inibir seletivamente esta isoforma e, assim, explorando os efeitos benéficos dos AINEs

sem exercer seus efeitos adversos (RAJAKARIAR et al., 2006), uma vez que a maioria dos AINEs inibe a COX-1 e a COX-2 de forma não seletiva e assim diminuem a produção de PGs gástricas em pequenas concentrações (<1µM). Os inibidores seletivos da COX-2, assim como os inibidores da COX-3 (paracetamol) preservam a proteção mediada por PGs gástricas. Entretanto, os inibidores seletivos da COX-2 em altas doses podem perder sua especificidade e também bloquear a COX-1 no estômago e duodeno causando danos (BLOT; MCLAUGHLIN, 2000; HAWORTH; BUCKLEY, 2007).

#### 2.2.2.2 Anti-inflamatórios esteroidais

Entre os anti-inflamatórios mais eficazes está a dexametasona, um glicocorticóide sintético. Os glicocorticóides atuam inibindo a gênese dos eicosanóides, através da indução da síntese de uma proteína específica chamada lipocortina que, por sua vez, inibe a enzima PLA<sub>2</sub>, bloqueando a liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidos de membrana (BARNES, 1998; ALENCAR et al., 2005). Os glicocorticóides bloqueiam não somente a síntese de prostanóides, como fazem os AINEs, mas também são capazes de inibir outros mediadores e fenômenos da inflamação, possuindo portanto, uma potente atividade anti-inflamatória (ALENCAR; ROCHA; PINHEIRO, 2005).

### 2.3 DOR

#### 2.3.1 Definição de dor

Em 1986, o Comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) definiu o processo doloroso como uma sensação e uma experiência desagradável, associada com um dano tecidual ou potencial. As sensações possuem vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (MILLAM, 1999).

### **2.3.2 Classificação da dor**

Do ponto de vista temporal, a dor é classificada como aguda e crônica e, sob a óptica da fisiopatologia, a dor pode ser denominada de acordo com o tipo da lesão e/ou dos mediadores envolvidos em “nociceptiva”, “neurogênica” e “psicogênica”, a qual está associada, respectivamente, com estimulação excessiva dos nociceptores, com lesão ao tecido neural, com disfunção do nervo ou com fatores psicológicos. Além disso, podem ocorrer manifestações dolorosas decorrentes de algumas desordens comumente apresentadas em pacientes que a experimentam como a hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta a um estímulo não-doloroso) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (SERPELL et al., 1998; MILLAN, 1999).

A dor aguda é aquela que está relacionada à instalação de um processo patológico, seja ele de origem traumática ou inflamatória. A dor deriva normalmente do excesso de nocicepção, porém pode resultar também da sensibilização ou da hipoatividade do sistema supressor da dor ou ambos. Ela serve de um sinal de alerta para a ocorrência da lesão. A resolução desse quadro normalmente acompanha a finalização do quadro doloroso. Caso a dor não se resolva com o fim do processo causal, persistindo, além da ausência da lesão, configura-se um dos quadros possíveis de dor crônica (CAVALCANTI; MADDALENA, 2003 apud MAI, 2007, p.26).

### **2.3.3 Percepção da dor**

A percepção da dor ocorre em dois estágios distintos. O primeiro, denominado nocicepção, refere-se à transdução do estímulo doloroso ao sistema nervoso central (SNC) por receptores especializados, os nociceptores. O segundo estágio é referente ao processamento elaborado dessa informação nociceptiva, levando à percepção consciente da dor (VITOR et al., 2008). Os nociceptores por sua vez, são representados por terminações nervosas livres presentes em fibras aferentes sensitivas, principalmente as fibras A $\delta$  e C (KIDD; URBAN, 2001). As fibras A $\delta$  são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades (ROCHA et al., 2007).

Os nociceptores, então, são sensibilizados pela ação de substâncias químicas, denominadas algio gênicas, presentes no ambiente tissular que resulta na



acumulação de metabólitos do ácido araquidônico. A produção de prostaglandinas e de leucotrienos leva a degranulação de mastócitos e a ativação direta de fibras nervosas, macrófagos e linfócitos. Há liberação de mediadores, como potássio, serotonina, substância P, histamina e cininas. Ocorrem alterações na permeabilidade vascular, no fluxo sanguíneo local e produção dos sinais clássicos inflamatórios de rubor, calor, dor, tumor e impotência funcional (ROCHA et al., 2007). Os principais neurotransmissores responsáveis pela transmissão do impulso nervoso das fibras aferentes primárias para os neurônios do corno dorsal da medula são a substância P e o glutamato (VITOR et al., 2008).

O primeiro passo na seqüência dos eventos que originam o fenômeno doloroso é a transformação dos estímulos agressivos de natureza térmica, química ou mecânica em potenciais de ação que, das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o SNC. Esses receptores específicos para a dor, localizados nas terminações de fibras nervosas A $\delta$  e C, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (SERPELL et al., 1998).

Após a interação direta ou indireta com neurônios aferentes primários no corno dorsal, os axônios de neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencefalo, incluindo tálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), formação reticular da medula, complexo amigdalóide, hipotálamo, entre outras (ALMEIDA et al., 2004). O envio da informação dolorosa para os centros superiores ocorre por meio das vias de projeção da dor ou trato anterolateral da coluna. As principais vias de condução da dor no SNC são o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico (CAILLIET, 1999; MILLAN, 1999). A partir do tálamo, neurônios de terceira ordem transmitem impulsos para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento que resulta em consciência da dor (VITOR et al., 2008).

#### **2.3.4 Teoria da Comporta**

A teoria mais aceita para explicar a regulação da dor é a teoria da comporta que se constitui em um modelo de percepção da dor no qual há uma regulação da passagem dos impulsos das fibras aferentes periféricas para o tálamo através dos

neurônios de transmissão no corno dorsal. Ela funciona como uma estação regulatória para a transmissão da dor.

As fibras aferentes nociceptivas transmitem o impulso doloroso para o tálamo através de células transmissoras da dor localizadas no corno dorsal na medula espinhal, constituindo a via de transmissão da dor, a qual é controlada pelos neurônios da substância gelatinosa (SG). Neurônios inibitórios descendentes ou influxo aferente não-nociceptivo ativam os neurônios da SG os quais, por sua vez, inibem as células transmissoras da dor dificultando a passagem do impulso doloroso para os centros superiores. Já a estimulação das fibras C, inibe os neurônios inibitórios da SG permitindo a passagem do impulso doloroso para o tálamo, constituindo-se então o processo de regulação da passagem do impulso doloroso para os centros superiores (VITOR et al, 2008).

### **2.3.5 Controle Central da Dor**

Descobertas recentes sugerem haver mecanismos inibitórios da transmissão do estímulo nociceptivo, não somente em segmentos medulares, como também em nível supraespinhal, constituindo o sistema analgésico endógeno. Os modelos descritos para o sistema inibitório descendente da dor consistem principalmente de quatro partes interligadas do SNC: a) sistemas corticais e diencefálicos; b) PAG e periventricular que são ricas em encefalinas e receptores opióides c) partes do bulbo rostral, especialmente o núcleo magno da rafe (NMR) e núcleos adjacentes que recebem impulsos excitatórios da PAG, e que por sua vez, enviam fibras serotoninérgicas e noradrenérgicas, via funículo dorsolateral, que se projetam para o corno dorsal da medula e bulbo; d) o corno dorsal bulbar e medular que recebe terminais de axônios do NMR e núcleos adjacentes (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Estas fibras descendentes são serotoninérgicas e terminam entre as células de transmissão nociceptiva nas lâminas I, II e V, onde inibem seletivamente neurônios nociceptivos, incluindo interneurônios e os tratos ascendentes que se projetam rostralmente, como os tratos espinotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico. Existe também o sistema opióide endógeno, representado pelos opióides endógenos e receptores opióides, e os neurônios noradrenérgicos, originários no locus ceruleus que representam outro importante grupo de fibras que

contribuem para a formação do sistema endógeno da dor (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

### **2.3.6 Agentes analgésicos e seus mecanismos de ação**

Na terapia da dor existem duas classes principais de drogas analgésicas. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os opióides.

#### **2.3.6.1 Analgésicos não opióides**

Os AINES estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: tratamento da inflamação, além de analgesia, antipirese e profilaxia contra doenças cardiovasculares. Em quadro álgico de intensidade moderada a grave, podem ser usados em associação com outros compostos, como opióides, por exemplo, reduzindo as doses analgésicas e a incidência de efeitos colaterais destes compostos (RIPAMONTI; BANDIERI, 2009).

#### **2.3.6.2 Analgésicos opióides**

Drogas opiáceas são compostos extraídos da semente da papoula. Essas drogas abriram caminho para a descoberta do sistema opióide endógeno no cérebro. O termo *opióide* inclui os *opiáceos* assim como compostos sintéticos ou semi-sintéticos com propriedades similares. A evidência sobre a existência de receptores opióides se baseou na observação de que os opiáceos (por exemplo, morfina) (OMS, 2007) produzem analgesia por meio da interação com receptores estereoespecíficos localizados em diferentes regiões do SNC, em níveis espinhal ou supra-espinhal, e fora do SNC (RIPAMONTI; BANDIERI, 2009).

Os opióides podem ser classificados como agonistas, agonistas-antagonistas e antagonistas, diferindo nos mecanismos de ação e ações farmacológicas de acordo com o receptor e suas características.

Com base no perfil farmacológico, o sistema opióide foi caracterizado pela presença de três principais receptores e subtipos acoplados à proteína G:  $\mu$  ( $\mu$ ),  $\kappa$  ( $\kappa$ ) e  $\delta$  ( $\delta$ ) (FERREIRA; FACCIONE, 2005; OMS, 2007). Eles diferem entre si por diferentes afinidades aos ligantes opióides endógenos e também às drogas

opióides exógenas. Os principais ligantes opióides são: encefalina, seletiva para receptores  $\delta$ ; dinorfina, seletiva para receptores  $k$ ; e endorfina a qual possui alta afinidade para receptores  $\delta$  e  $\mu$  e baixa afinidade para receptores  $k$  (VITOR et al, 2008).

Dessa forma, a ativação dos receptores opióides  $\mu$ ,  $k$  e  $\delta$  nos neurônios endógenos, apresenta inúmeras conseqüências: a) a inibição da atividade da adenilciclase levando a uma redução da concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), b) a abertura dos canais de  $K^+$ , causando a hiperpolarização do neurônio nociresponsivo, com conseqüente redução da excitabilidade e c) o bloqueio da abertura dos canais de  $Ca^{++}$  voltagem-dependentes, inibindo a liberação do glutamato e da substância P pelos terminais aferentes primários. Estes são os mecanismos que explicam o bloqueio opióide da liberação de neurotransmissores e da transmissão da dor em várias vias neuronais (FERREIRA; FACCIONE, 2005).

O subtipo  $\mu$  do receptor opióide é o alvo primário da morfina que é um exemplo de agonista de receptores opióides (FERREIRA; FACCIONE, 2005; OMS, 2007). Trata-se de um fármaco de escolha no tratamento da dor crônica, de moderada a grave, sendo considerada como padrão-ouro dos opióides. Além disso, foi colocada pela OMS em sua Lista de Medicamentos Essenciais (RIPAMONTI; BANDIERI, 2009).

A naloxona é um exemplo de medicamento que bloqueia os efeitos da morfina, atuando como antagonista nos receptores opióides (OMS, 2007). Sua maior indicação reside no antagonismo dos efeitos colaterais dos narcóticos utilizados em anestesia geral (IMBELONI, 1989), sendo também especialmente útil na prevenção de recaídas ao bloqueiar todos os efeitos dos opiáceos (OMS, 2007). Ressalta-se também que a naloxona obtém uma relação cérebro-plasma 12 a 15 vezes maior do que a morfina e que seu início de ação por via muscular ou subcutânea é aproximadamente de 15 min. Estudos tendo confirmado que a difusão e a eliminação cerebral da naloxona são os principais fatores de sua grande potência e ação de curta duração (IMBELONI, 1989).

É válido ressaltar que cada paciente tem o seu próprio limiar de dor. Sono adequado, elevação do humor, empatia, todos esses fatores podem aumentar o limiar da dor do indivíduo. Alternativamente, fadiga, ansiedade, medo, raiva, tristeza, depressão, podem diminuir o limiar da dor (RIPAMONTI; BANDIERI, 2009).

Considerando que a dor é um problema universal e seu tratamento consiste em um dos principais desafios para a terapêutica médica, pesquisas têm sido extensamente realizadas a fim de esclarecer um melhor entendimento do mecanismo da dor, bem como identificar tratamentos mais efetivos (MERCADANTE, 1999). Pois, apesar dos avanços significativos relacionados principalmente à síntese de novos compostos e ao aparecimento de novos derivados, os opióides e os AINEs, mesmo com seus efeitos adversos, continuam sendo os fármacos de primeira escolha para o tratamento da dor (MILANO, 2008).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

- Isolar a bergenina a partir das cascas do caule de *Endopleura uchi* e posteriormente realizar a sua acetilação a fim de torná-la mais lipofílica e testar o derivado obtido, acetilbergenina, em modelos de nocicepção e de inflamação.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Isolar a bergenina a partir das cascas do caule de *Endopleura uchi*.
- Obter o derivado acetilbergenina a partir da acetilação da bergenina.
- Determinar a DE<sub>50</sub> de acetilbergenina
- Avaliar a atividade antinociceptiva de acetilbergenina em modelos de contorção abdominal, placa quente e formalina.
- Estudar a atividade anti-edematogênica de acetilbergenina em ratos.
- Determinar a atividade anti-inflamatória de acetilbergenina na peritonite induzida por carragenina em ratos.
- Caracterizar o efeito de acetilbergenina na dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos.
- Analisar o potencial ulcerogênico de acetilbergenina em modelo de úlcera gástrica induzida por estresse em ratos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os processos de fracionamento, isolamento da bergenina e obtenção de acetilbergenina foram realizados no Laboratório do Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os estudos das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de acetilbergenina foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFPA. Os ensaios de migração celular e de úlcera gástrica com a substância acetilbergenina foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

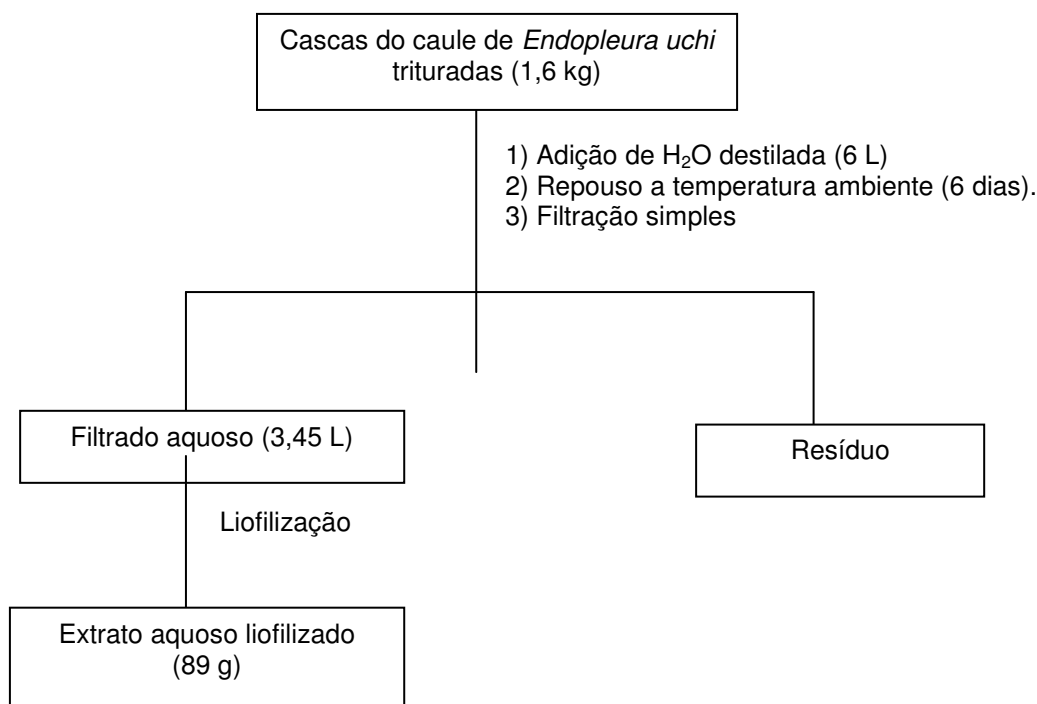
As cascas do caule de *Endopleura uchi* foram coletadas na cidade de Ananindeua, Estado do Pará, em 03 de abril de 2005, em mata de terra firme e a identificação efetuada por botânicos da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), cuja exsicata encontra-se depositada no herbário desta instituição sob código n. 180611. Os ramos, coletados para a confecção desta exsicata, foram descritos como sendo de uma árvore de 28 m de altura, base reta; ritidoma marrom, com desprendimento em placas pequenas; casca morta marrom, casca viva avermelhada soltando em fibras, lenticelas marrons; alburno amarelado; folha coriácea, peciolada, borda serrilhada, alternas; frutos verdes, o que confirma com as informações descritas na literatura (MARX, et al., 2002).

### 4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

#### 4.2.1 Caule

O material botânico (cascas do caule) seco em temperatura ambiente foi triturado em moinho, fornecendo 3,23 kg de um pó finamente pulverizado. Em 1,6 kg desse material foram adicionados 6 litros de água destilada, deixando-o em maceração por 6 dias. O material foi filtrado pelo método de filtração simples. Foram obtidos 3,4 L do filtrado aquoso, que após realizar a concentração o filtrado

concentrado foi submetido à liofilização fornecendo 89 g de extrato bruto aquoso liofilizado (Figura 6).



**Figura 6-** Fluxograma de obtenção do extrato aquoso liofilizado de *Endopleura uchi*.

### 4.3 FRACIONAMENTOS CROMATOGRÁFICOS

O extrato aquoso liofilizado foi fracionado por Cromatografia em Coluna por Via ÚMIDA (CCVU), utilizando sistemas de solventes (hexano, acetato de etila e metanol) com polaridade crescente. As alíquotas (100 mL cada) foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em sílica-gel e reveladas com solução de sulfato cérico. Estes procedimentos serão descritos com mais detalhes a seguir.

#### 4.3.1 Fracionamento do Extrato Aquoso Liofilizado

O fracionamento do extrato aquoso liofilizado (5 g) foi realizado em CCVU empacotada com sílica-gel e eluída com sistemas de solventes Hexano, Hexano/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em seqüência de polaridade crescente, obtendo-se assim um total de 66 frações ( F1-F66 ). Na Tabela 1 estão incluídos os dados deste procedimento.

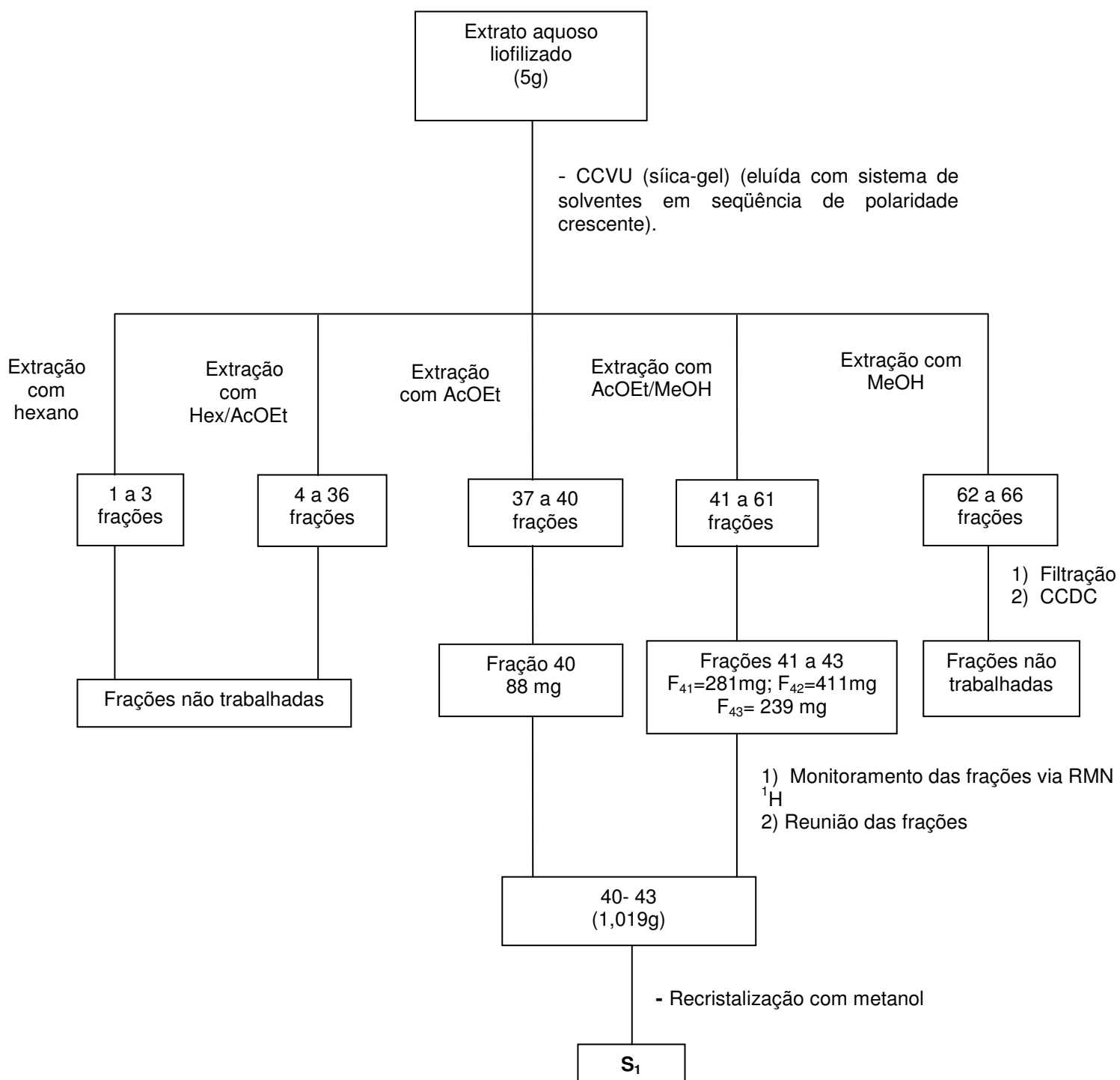


**Tabela 1-** Frações obtidas da CCVU do extrato aquoso liofilizado de *E. uchi*

SISTEMAS	FRAÇÕES	MASSAS OBTIDAS
Hexano 100%	1 a 3	16 mg
Hex:AcOEt 20%	4 a 7	20 mg
Hex:AcOEt 25%	8 a 11	73 mg
Hex:AcOEt 27,5%	12 a 14	67 mg
Hex:AcOEt 30%	15 a 19	113 mg
Hex:AcOEt 35%	20 a 23	97 mg
Hex:AcOEt 40%	24 a 27	105 mg
Hex:AcOEt 45%	28	30 mg
Hex:AcOEt 50%	29 a 31	120 mg
Hex:AcOEt 60%	32	20 mg
Hex:AcOEt 65%	33	25 mg
Hex:AcOEt 70%	34	28 mg
Hex:AcOEt 80%	35	38 mg
Hex:AcOEt 90%	36	34 mg
AcOEt 100%	37 a 40	238 mg
AcOEt:MeOH 5%	41	281 mg
AcOEt:MeOH 10%	42 a 43	650 mg
AcOEt:MeOH 20%	44 a 45	110 mg
AcOEt:MeOH 30%	46 a 50	299 mg
AcOEt:MeOH 40%	51 a 56	364 mg
AcOEt:MeOH 50%	57	62 mg
AcOEt:MeOH 70%	58 a 59	157 mg
AcOEt:MeOH 80%	60 a 61	149 mg
MeOH 100%	62 a 66	256 mg

#### 4.3.2 Obtenção da Bergenina (S<sub>1</sub>)

As frações 40 (AcOEt), 41 (AcOEt/MeOH 10%), 42 e 43 (AcOEt/MeOH 20%), procedentes da coluna cromatográfica por via úmida, formaram precipitado branco na forma de cristais, os quais foram separados do sobrenadante por filtração, fornecendo 88 mg, 281 mg, 411 mg e 239 mg de massas, respectivamente. A análise por CCDC e monitoramento via RMN <sup>1</sup>H dessas frações, indicou tratar-se da mesma substância. Os cristais foram reunidos (1,019g) e recristalizados em metanol, obtendo-se a bergenina (S<sub>1</sub>). A figura 7 ilustra os procedimentos de obtenção da substância.

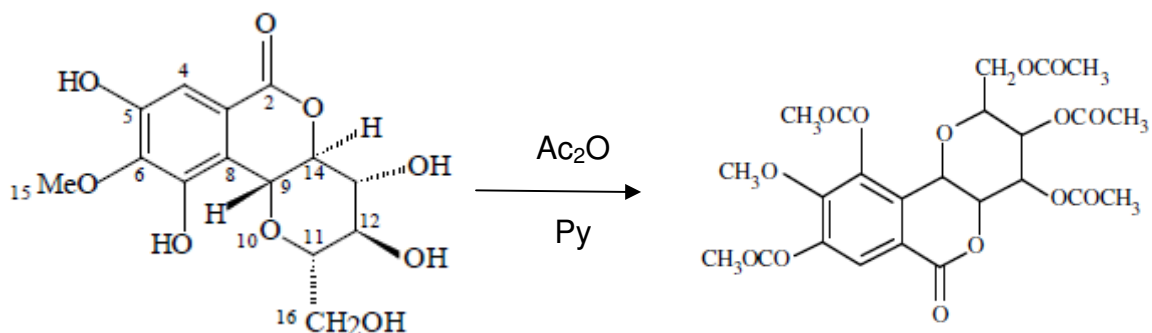


**Figura 7-** Fluxograma de obtenção da bergenina (**S<sub>1</sub>**) a partir do extrato aquoso liofilizado das cascas de *Endopleura uchi*.

## 4.4 REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DA BERGENINA

### 4.4.1 Obtenção de Acetilbergenina (S<sub>5</sub>)

A partir da bergenina (S<sub>1</sub>) foi efetuado a reação de acetilação e obtido o derivado acetilbergenina (S<sub>5</sub>) (Figura 8) (RAMAIAH et al., 1979).



**Figura 8-** Reação de acetilação para obtenção de acetilbergenina

Em um balão de fundo redondo de 125 mL foram adicionados 700 mg de bergenina (S<sub>1</sub>), 17,5 mL de anidrido acético e 6,5 mL de piridina anidra. Após ter sido agitada, a mistura de reação foi mantida por 24 horas a temperatura ambiente e em seguida, transferida para um funil de separação de 125 mL. Foram adicionados 25 mL de água destilada e extraído com acetato de etila (3x 40 mL). As fases orgânicas foram reunidas, lavadas com água destilada (2x 40 mL), solução de ácido clorídrico a 5% (1x 40 mL), e então com água destilada (2x 40 mL) até pH neutro. A fase orgânica foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e após filtração, o solvente foi evaporado a temperatura ambiente em capela. Os sólidos brancos obtidos em forma de cristais foram recristalizados em metanol a quente obtendo-se 1,13 g (rendimento 99%) de cristais incolores da substância S<sub>5</sub>.

## 4.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE ACETILBERGENINA

### 4.5.1 Animais utilizados

Foram utilizados para realização deste estudo, camundongos Swiss albinos machos, adultos, pesando entre 20-25 g e ratos MacCoy machos, 180-200 g, todos provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas de Belém-PA. Para os experimentos de migração celular e de úlcera gástrica, foram utilizados ratos Wistar machos, 180-200 g, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP – Campinas – SP.

Os animais foram mantidos em gaiolas, à temperatura ambiente ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ) com ciclo claro/escuro de 12 horas, mantidos no Biotério Setorial do Instituto de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA), tratados com alimentação e água “*ad libitum*”. Doze horas antes do início dos experimentos, os animais foram mantidos somente com água “*ad libitum*”. Os animais permaneceram no laboratório por um período de adaptação de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. O manuseio e uso de animais estão de acordo com as normas institucionais (Parecer MED 010/2008-CEPAE/UFPA).

### 4.5.2 Administração das drogas

Acetilbergenina foi dissolvida em DMSO 2% e Tween 80 2% e diluída em água destilada. Os grupos controles negativos receberam o mesmo veículo utilizado para solubilizar a substância acetilbergenina (DMSO e Tween 80 2% e diluída em água destilada). As drogas utilizadas ao longo dos experimentos tais como, ácido acético 0,6%, carragenina 1%, dextrana 1%, ciproheptadina (10 mg/kg), formaldeído 1%, morfina (4 mg/kg), naloxona (1 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg), indometacina (5 mg/kg) e ácido acetilsalicílico (100 mg/kg) foram dissolvidas e diluídas diretamente em solução fisiológica a 0,9%. O óleo de cróton (2,5%) foi solubilizado em acetona. O volume total de solução administrada, por via oral, foi de 10 mL/kg para camundongos e 1,0 mL/kg para ratos, e quando administrada por via

intraplantar, o volume total de solução foi de 20  $\mu$ L/pata para camundongos e 100  $\mu$ L/pata para ratos.

### **4.5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva de acetilbergenina *in vivo***

#### **4.5.3.1 Teste de contorções abdominais**

O teste é realizado com base na técnica de Koster et al. (1959). O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6%v/v (0,1 mL/10 g; i.p.), que consiste em contrações da parede abdominal seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores em camundongos. Grupos de animais foram tratados com acetilbergenina nas doses (1, 5, 10, 15 e 25 mg/kg, v.o.), indometacina (5 mg/kg, v.o) e o grupo controle tratado somente com veículo, após 60 minutos os animais receberam uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6%. Decorridos 10 minutos da administração do ácido acético, o número de contorções abdominais foi quantificado, para cada animal, durante um período de 20 minutos. Todos os grupos foram constituídos de 10 animais.

#### **4.5.3.2 Determinação da Dose efetiva (DE<sub>50</sub>)**

A determinação da DE<sub>50</sub> teve como base o teste das contorções induzidas pelo ácido acético 0,6%, i.p. em camundongos. Neste ensaio, os animais receberam, por via oral, acetilbergenina uma hora antes da aplicação do estímulo. As doses utilizadas foram: 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg e 25 mg/kg. A DE<sub>50</sub> foi determinada através da plotagem direta das doses utilizadas e as respectivas percentagens de inibição.

#### **4.5.3.3 Teste da placa quente**

O teste da placa quente foi realizado de acordo com o método de Eddy e Leimback (1953) e consiste em avaliar a latência (tempo que o animal leva para lambe uma das patas ou pular) após colocado na placa quente sob temperatura de 55 °C. Um dia antes do teste, os animais foram pré-selecionados submetendo-os à

placa quente e descartando aqueles que tiveram o tempo de reação na placa superior a 20 minutos. O tempo de corte de latência na placa quente foi de 30 minutos. Os experimentos foram iniciados imediatamente após a administração de acetilbergenina na dose efetiva de 6,8 mg/kg e do grupo controle que recebeu apenas veículo. Um grupo foi tratado com morfina (10 mg/kg, s.c.) e em seguida colocados na placa aquecida. Todos os grupos foram constituídos de 10 animais.

#### 4.5.3.4 Teste de formalina

Um volume de 20  $\mu$ L de formalina a 1% (em salina estéril) foi aplicado no espaço subplantar da pata direita dos camundongos e a duração do tempo de lambida foi determinada de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 30 minutos (2ª fase) (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A substância acetilbergenina foi administrada (6,8 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da injeção da formalina. O grupo controle recebeu apenas veículo uma hora antes da administração da formalina e o outro grupo de animais recebeu a droga padrão morfina (4 mg/kg, s.c) 30 minutos antes da formalina.

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opióide no efeito de acetilbergenina foi realizada a sua co-administração (6,8 mg/kg, v.o., 60 minutos antes da formalina) e do antagonista opióide naloxona (1 mg/kg, i.p., 15 minutos antes de acetilbergenina). Todos os grupos foram constituídos de 10 animais.

### 4.5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória de acetilbergenina *in vivo*

#### 4.5.4.1 Edema de pata de rato por carragenina

O modelo de edema de pata em ratos foi realizado de acordo com Winter et al. (1962), com algumas modificações. O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 100  $\mu$ L de carragenina (lambda) à 1% na pata direita de ratos da linhagem MacCoy. Na pata esquerda foi injetado igual volume de salina. Grupos de animais foram tratados com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), indometacina (5 mg/kg, v.o) e o grupo controle tratado somente com veículo, após 60 minutos receberam injeção intraplantar de carragenina na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda. Depois das injeções o desenvolvimento do edema da pata esquerda e

direita foi avaliado em milímetros com auxílio de paquímetro (Mitutoyo Co., Japan), medido nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção intraplantar de carragenina. O edema foi calculado através da diferença de volume entre a pata direita e a esquerda.

#### 4.5.4.2 Edema de pata de rato por dextrana

O modelo de edema de pata em ratos foi realizado de acordo com Parrat e West (1958). O edema foi induzido pela injeção intraplantar de 100  $\mu$ L de dextrana à 1% na pata direita de ratos da linhagem MacCoy. Na pata esquerda foi injetada igual volume de salina. Grupos de animais foram tratados com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), outro grupo com ciproheptadina (10 mg/kg, v.o) e o grupo controle tratado com veículo, após 60 minutos receberam injeção intraplantar de dextrana na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda. Depois das injeções o desenvolvimento do edema da pata esquerda e direita foi avaliado em milímetros com auxílio de paquímetro (Mitutoyo Co., Japan), medido nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção intraplantar de carragenina. O edema foi calculado através da diferença de volume entre as patas direitas e esquerdas.

#### 4.5.4.3 Peritonite induzida por carragenina

Trinta minutos antes da injeção do agente flogístico, grupos de ratos da linhagem Wistar foram tratados com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), dexametasona (0,5 mg/Kg, v.o.) e o grupo controle tratado com veículo. Para a indução da peritonite, os animais foram submetidos à injeção de 3 mL de solução de carragenina kappa, tipo III (1%) na cavidade peritoneal (100  $\mu$ g/mL) Após 4 horas, foram sacrificados por inalação de CO<sub>2</sub> e imediatamente submetidos à cirurgia para abertura do abdômem. A cavidade peritoneal foi então lavada com 10 mL de PBS heparinizado (1 mL/1000 mL de PBS) e após realizar compressões leves no abdomen dos ratos, o fluido peritoneal foi coletado. Foram realizadas as contagens totais e a diferencial das células presentes. Os resultados obtidos na contagem diferencial foram expressos como número de neutrófilos/mL do lavado peritoneal. Para realização da contagem total, 20  $\mu$ L do lavado peritoneal foi diluído em 0,4 mL da solução de Turk. Realizou-se a contagem em câmara de Neubauer e parte do

lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante foi ressuspenso em 0,4 mL de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. E então foi feito o esfregaço celular em lâmina própria (SOUZA; FERREIRA, 1985). As células foram coradas pelo corante pancrômico de Rosenfeld e contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo. Contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células.

#### 4.5.4.4 Dermatite induzida pelo óleo de cróton

Realizou-se o experimento segundo a metodologia descrita por Tubaro et al (1985). A indução da dermatite ocorreu por aplicação tópica de 20 µL de uma solução de óleo de Cróton (2,5% em acetona) na superfície interna da orelha direita dos camundongos. Na orelha esquerda foi aplicado volume equivalente do solvente (acetona). Uma hora antes da aplicação, foi realizado o tratamento por via oral, sendo um grupo (n=7) tratado com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), outro grupo (n=9) com ácido acetilsalicílico (100 mg/kg, v.o), e o grupo controle (n=9) tratado com o veículo. A avaliação da resposta anti-inflamatória ocorreu 6 h após a aplicação do estímulo. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro das orelhas foram removidos com auxílio de um punch de biópsia e, estabelecida a diferença do peso entre a amostra da orelha controle (esquerda) e a orelha estimulada (direita), expressando os resultados obtidos em peso (mg).

#### 4.6 TESTE PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA EM RELAÇÃO À LESÃO GÁSTRICA (lesões agudas induzidas por estresse)

A indução das lesões gástricas por estresse baseou-se no método descrito por Basile et al. (1990). Os ratos da linhagem Wistar foram mantidos em jejum durante 24 horas. Após este período, os diferentes grupos foram tratados com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) e o grupo controle tratado com o veículo. Após trinta minutos, imobilizou-se cada rato em um compartimento individual (tubo contensor), imergindo-os, verticalmente, até a região



xifóide, em reservatório contendo água corrente a temperatura de 25° C, onde permaneceram por 17 horas em ambiente iluminado. Após este período, cada animal foi retirado do tubo contensor e praticado a eutanásia. Os estômagos foram retirados imediatamente e abertos ao longo da grande curvatura. Cada estômago foi fixado em lâmina de isopor e submetido ao exame de lesões, usando lupa estereomicroscópica binocular com amplitude de 10 X. Contou-se o número e severidade das lesões induzidas pelo estresse classificando-as em:

**Tipo I (N<sub>1</sub>):** Presença de edema, hiperemia e hemorragias puntiformes (petéquias);

**Tipo II (N<sub>2</sub>):** Presença de lesões hemorrágicas com pequenas erosões na submucosa;

**Tipo III (N<sub>3</sub>):** Presença de erosões severas com bordas hemorrágicas e algumas lesões invasivas.

Determinou-se o índice de lesão (IL) a partir da seguinte fórmula descrita por Basile et al., 1980:

$$IL = \frac{(N_3 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_1 \times 1)}{n}$$

Onde: N<sub>1</sub>, N<sub>2</sub>, N<sub>3</sub> correspondem ao número de ulcerações encontradas de cada tipo, e n ao número de animais utilizados no experimento.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média + E.P.M. (Erro Padrão da Média), onde *n* representa o número de animais. Alguns dados foram analisados por meio do teste “*t*” de Student e outros por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls, que realiza a comparação de todos os grupos entre si. Adotou-se o nível de significância de 5% (*P* < 0,05). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Sigma Stat<sup>®</sup>.

#### 4.8 APARELHAGEM E MATERIAIS USADOS

##### CENTRÍFUGA CLÍNICA

A centrífuga “Quimis mod. – Q.222.T” foi utilizada na centrifugação do lavado peritoneal no teste de migração celular.

##### MICROSCÓPIO ÓPTICO

Para as análises microscópicas foi utilizado o microscópio “Bioval mod. - L2000A”.

##### LUPA ESTEREOMICROSCÓPICA

Para contagem das úlceras gástricas foi utilizada a lupa estereomicroscópica “Olympus-SD30”

##### PAQUÍMETRO

Para as medições no edema de pata foi utilizado o paquímetro digital “Mitutoyo”.

##### PLACA QUENTE (“HOT-PLATE”)

Na avaliação da atividade analgésica central, foi utilizado um banho-maria marca “Fanem Ltda”, no qual foi adaptado uma placa de alumínio (33,5 cm X 19 cm) e um prato de alumínio de 20 cm de diâmetro. Para acomodar os camundongos foi utilizado um funil de vidro de 17 cm de diâmetro. A temperatura do banho-maria foi ajustada para 55° C.

##### CONTADOR DIFERENCIAL DE CÉLULAS

Contador diferencial de células “Phoenix mod. - EC-2088” foi utilizado para contagem diferencial de células no teste de migração celular

##### ESPECTRÔMETRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados em espectrômetro modelo Mercury 300/Varian operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

##### CÂMARA DE ANÁLISE DE FLUORÊSCENCIA POR LUZ ULTRAVIOLETA

Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10.

Luz tipo SPECTROLINE modelo ENF-260C.

## BALANÇA ANALÍTICA

Para a pesagem das substâncias foi utilizada a balança “SARTORIUS modelo BP210S”

## EVAPORADOR ROTATIVO

Modelo Laborota 4000.

## SÍLICA GEL

### **Fases estacionárias utilizadas para análises cromatográficas:**

- Sílica gel 70-230 mesh para CC (MERCK)
- Sílica gel 60GF254 para CCDC (MERCK)

## 4.9 DROGAS, SOLUÇÕES E SOLVENTES

### **DROGAS**

- Ácido Acético P.A (VETEC Química Fina, Ltda, RJ).
- Ácido acetilsalicílico (Aspirina<sup>®</sup>, Bayer, Brasil)
- Carragenina Kappa, Tipo III (Iota-Fluka-Biochemika Co.)
- Carragenina Lambda, Tipo IV (Sigma, USA)
- Cloridrato de Ketamina (Vetanarcol<sup>®</sup>, König, Argentina)
- Cloridrato de Naloxona (Cristália, Brasil)
- Cloridrato de Xilazina (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Brasil)
- Dexametasona fosfato dissódico (Laboratório Aché, SP)
- Dextrana (Sigma, USA)
- DMSO (Sigma, USA)
- Formaldeído P.A (VETEC Química Fina Ltda, RJ).
- Hidrocloridrato de Ciproheptadina (Sigma Chemical Co, St Louis MO., USA)
- Indometacina (Sigma, USA)
- Óleo de cróton (Sigma Chemical Co, St Louis MO., USA)
- Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Laboratório Tayuyna Ltda, SP).
- Sulfato de Morfina (Cristália, Brasil)
- Tween 80 (Merck, RJ).

## SOLUÇÕES

Salina Tamponada com fosfato (PBS)

Cloreto de sódio P.A	8.0 g
Cloreto de potássio P.A	0.2 g
Fosfato de sódio dibásico P.A	1.15 g
Fosfato de sódio monobásico P.A	0.2 g
Água destilada q.s.p	1.0 L
pH 7.4	

Solução de Turk

Ácido acético glacial P.A	20.0 mL
Azul de metileno	0.5 mL
Água destilada	1.0 L

Corante pancrômico de Rosenfeld

Gienza-azul-eosina azul de metileno	97.0 mg
May-Grunwald-eosina azul de metileno	53.0 mg
Metanol P.A	1.0 L

## SOLVENTES

**Para as preparações dos extratos orgânicos e análises cromatográficas foram utilizados os seguintes solventes:**

- Solventes P.A. da SYNTH, CRQ, NUCLEAR E QUIMEX: Hexano, acetato de etila e metanol;
- Solventes grau HPLC da Tedia Brasil: Metanol, hexano e acetato de etila

**Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados:**

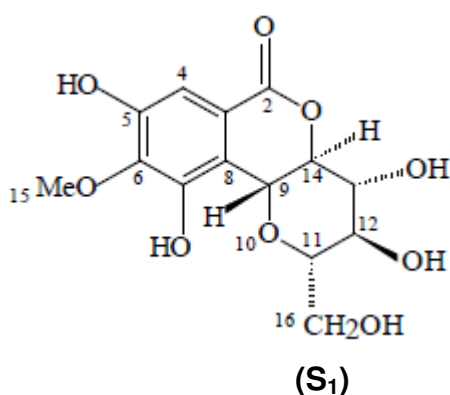
- Solventes deuterados das marcas "SIGMA CHEMICAL Co. e ACRÓS":  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{DMSO-d}_6$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÕES DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS

#### 5.1.1 Bergenina (S<sub>1</sub>)

A bergenina foi isolada como cristais incolores e sua estrutura foi definida com base nas análises dos espectros de RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C uni e bidimensionais.



**Origem:** caule

**Extrato:** aquoso liofilizado

**Massa obtida:** 1,019g

**RMN <sup>1</sup>H:** Figura 18, página 103

**RMN <sup>13</sup>C:** Figura 22, página 107

As tabelas 2 e 3 mostram os dados espectrométricos da substância isolada em comparação com aqueles das literaturas (MAGALHÃES, et al., 2007; RAMAIAH et al., 1979).

**Tabela 2-** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) de **S<sub>1</sub>**

Hidrogênios	$\delta_{\text{H S}_1}$ (ppm)	$\delta_{\text{H S}_1}$ (ppm) - Literatura* (DMSO- $d_6$ , 400 MHz)
4	6,98 ( <i>s</i> )	6,98 ( <i>s</i> )
9	4,97 ( <i>d</i> , 10,5 Hz)	4,98 ( <i>d</i> , 10,4 Hz)
11	3,57 ( <i>tl</i> , 8,4 Hz)	3,57 ( <i>ddd</i> , J= 9,5; 7,6 e 2,0 Hz)
12	3,20 ( <i>td</i> , 4,8 e 12,9 MHz)	3,20 ( <i>m</i> )
13	3,65 ( <i>m</i> )	3,65 ( <i>tl</i> )
14	3,99 ( <i>tl</i> , J=9,6 Hz)	3,99 ( <i>dd</i> , J=10,4 e 9,5 Hz)
15	3,77 ( <i>s</i> )	3,77 ( <i>s</i> )
16a	3,85 ( <i>dl</i> , J=11,1 Hz)	3,85 ( <i>dd</i> , J=11,7 e 2,0Hz)
16b	3,42 ( <i>m</i> )	3,44 ( <i>m'</i> )

\*MAGALHÃES et al. 2007.

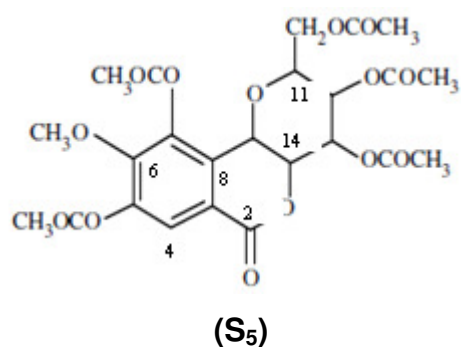
**Tabela 3-** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ ) de **S<sub>1</sub>**

C	$\delta_{\text{C}} \text{ S}_1$	$\delta_{\text{C}} \text{ S}_1$ - Literatura* (DMSO- $d_6$ , 100 MHz)
2	163,5	163,6
3	118,2	117,9
4	109,5	109,8
5	151,1	150,9
6	140,7	140,6
7	148,2	148,0
8	116,0	115,6
9	81,8	81,7
11	70,8	70,7
12	72,2	72,6
13	73,8	73,9
14	79,9	80,0
15 (OMe)	59,9	60,0
16 (CH <sub>2</sub> )	61,2	61,3

\*RAMAIAH et al., 1979.

### 5.1.2 Acetilbergenina (S<sub>5</sub>)

Acetilbergenina foi obtido a partir da acetilação da bergenina (S<sub>1</sub>) com anidrido acético e piridina à temperatura ambiente, como cristais incolores.



Sólido cristalino em forma de agulhas;

**Massa obtida:** 1,13 g

**RMN <sup>1</sup>H:** Figura 24, página 109

**RMN <sup>13</sup>C:** Figura 29, página 114

As tabelas 4 e 5 mostram os dados espectrométricos de acetilbergenina (S<sub>5</sub>) em comparação com aqueles da literatura (RAMAIAH, et al., 1979).

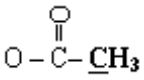
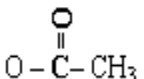


**Tabela 4** - Dados de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de **S<sub>5</sub>**

Hidrogênios	$\delta_{\text{H}}$ <b>S<sub>5</sub></b>	$\delta_{\text{H}}$ <b>S<sub>5</sub></b> Literatura* ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)
4	7,75 (s)	7,75 (s)
9	4,80 (d, 10,8 Hz)	4,81 (d, 10 Hz)
11	3,80 (ddd, 12,9; 3,9 e 2,1 Hz)	3,79 (m)
12	5,11 (t, 9,9 Hz)	5,09 (t, 10 Hz)
13	5,46 (t, 9,9 Hz)	5,47 (t, 10 Hz)
14	4,34 (t, 10,2 Hz)	4,32 (t, 10 Hz)
16a	4,29 (dd, 12,9 e 2,1 Hz)	4,31 (dd, 13 e 2 Hz)
16b	4,13 (dd, 12,9 e 3,9 Hz)	4,11 (dd, 13 e 4 Hz)
15 (OMe)	3,89 (s)	3,89 (s)
OAc	2,33 2,32 2,09 2,08 2,05	2,30 (s, x 2) 2,07 (s, x 2) 2,03 (s)

\*RAMAIAH et al., 1979.

**Tabela 5-** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de  $\text{S}_5$

C	$\delta_{\text{C}} \text{S}_5$	$\delta_{\text{C}} \text{S}_5$ Literatura* ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)
2	161,56	161,37
3	118,55	118,52
4	123,96	123,82
5	144,10	143,98
6	149,95	149,82
7	141,23	141,19
8	129,45	129,43
9	76,57	76,57
11	68,12	68,21
12	72,05	72,08
13	72,77	72,69
14	76,57	76,57
16 ( $\text{CH}_2$ )	61,72	61,79
15 (OMe)	61,44	61,39
	20,54 (3x) 20,69 (2x)	20,52 (3x) 20,67 (2x)
	167,62 168,23 169,61 169,99 170,46	167,41 167,98 169,36 169,70 170,17

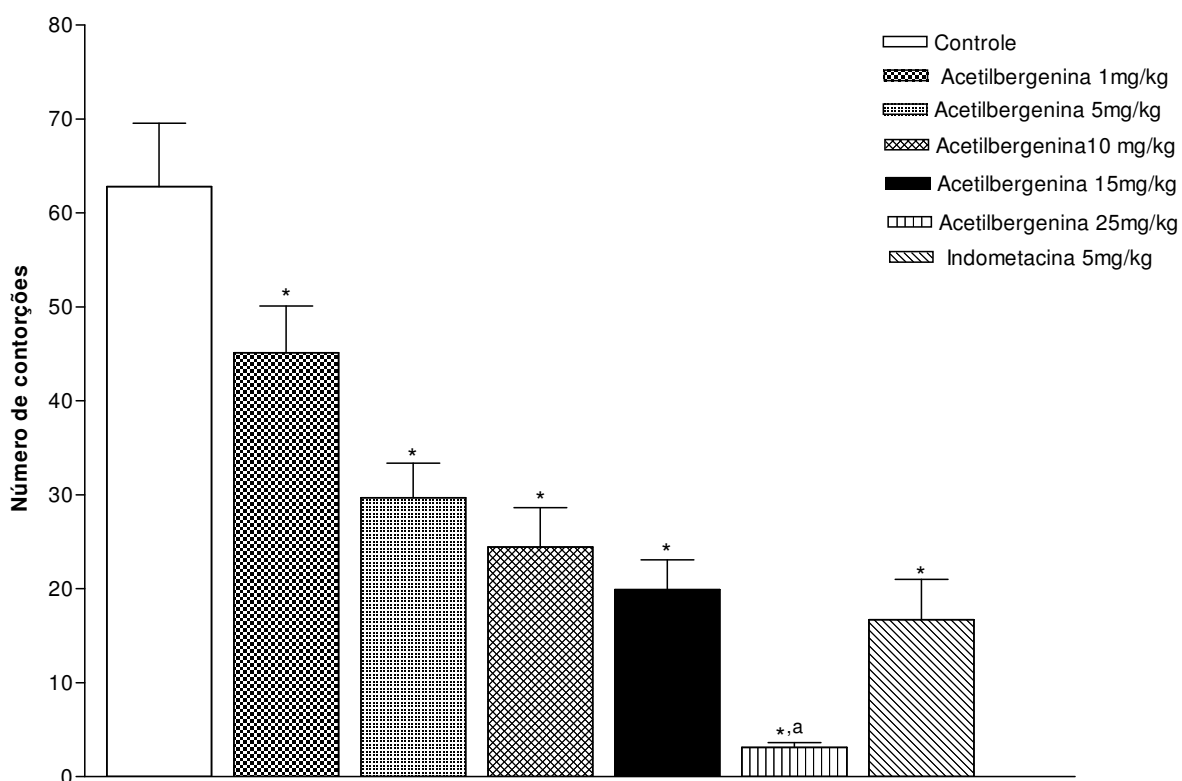
\*RAMAIAH et al., 1979

## 5.2 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DE ACETILBERGENINA

### 5.2.1 Avaliação da atividade antinociceptiva de acetilbergenina *in vivo*

#### 5.2.1.1 Teste de contorções abdominais

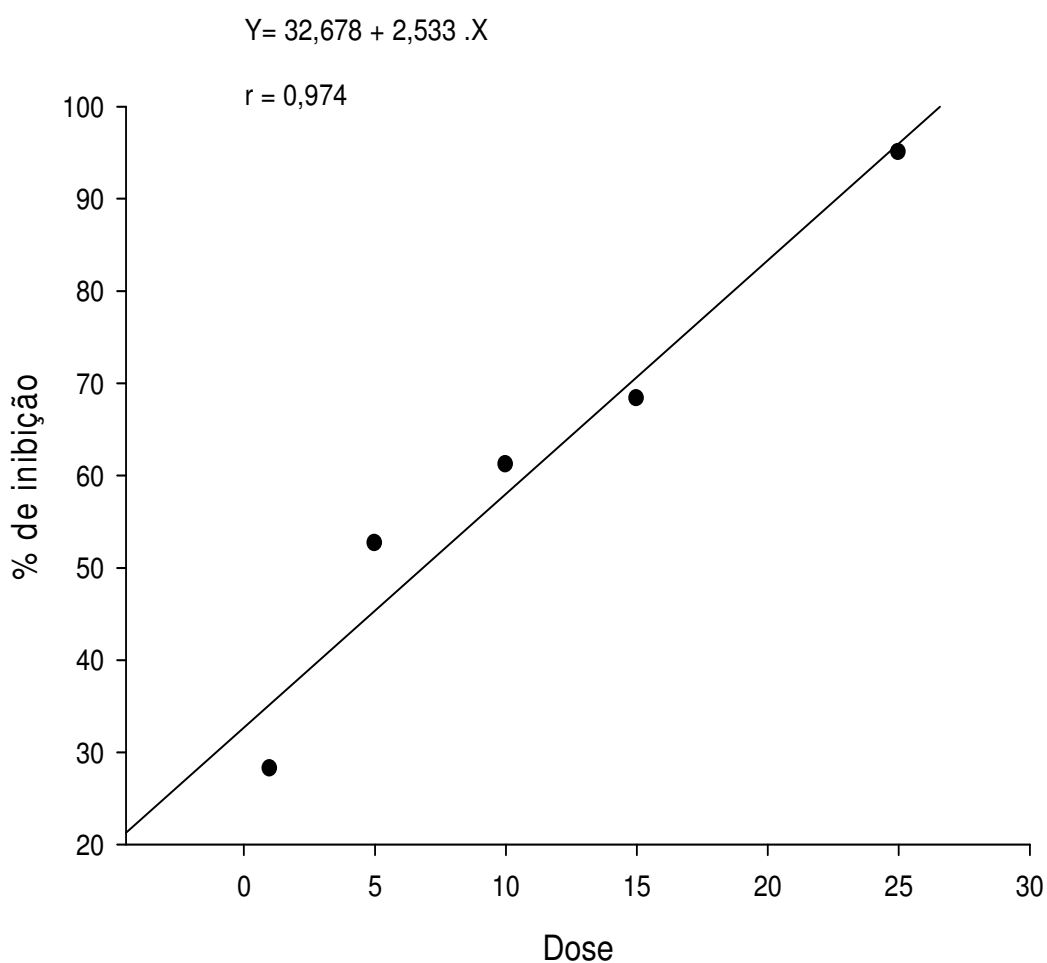
Os resultados apresentados na Figura 9 e Tabela 6 mostram o efeito dose-dependente da administração oral de acetilbergenina sobre o número de contorções abdominais, induzido pelo ácido acético 0,6%, i.p. As doses 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg e 25 mg/kg bloquearam o número de contorções abdominais em 28,18%, 52,87%, 61,15%, 68,31% e 95%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle. A indometacina (5 mg/kg), um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, utilizado como droga padrão neste teste, diminuiu em aproximadamente 73,41% o número de contorções abdominais nos animais quando comparada ao grupo controle.



**Figura 9-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e indometacina (5 mg/kg, v.o.), sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos. Cada coluna representa a média ± E.P.M de 10 animais. \* $P < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle; <sup>a</sup> $P < 0,05$ , quando comparado à indometacina (ANOVA, seguida do Teste de Student-Newman-Keuls).

### 5.2.1.2 Determinação da Dose Efetiva (DE<sub>50</sub>)

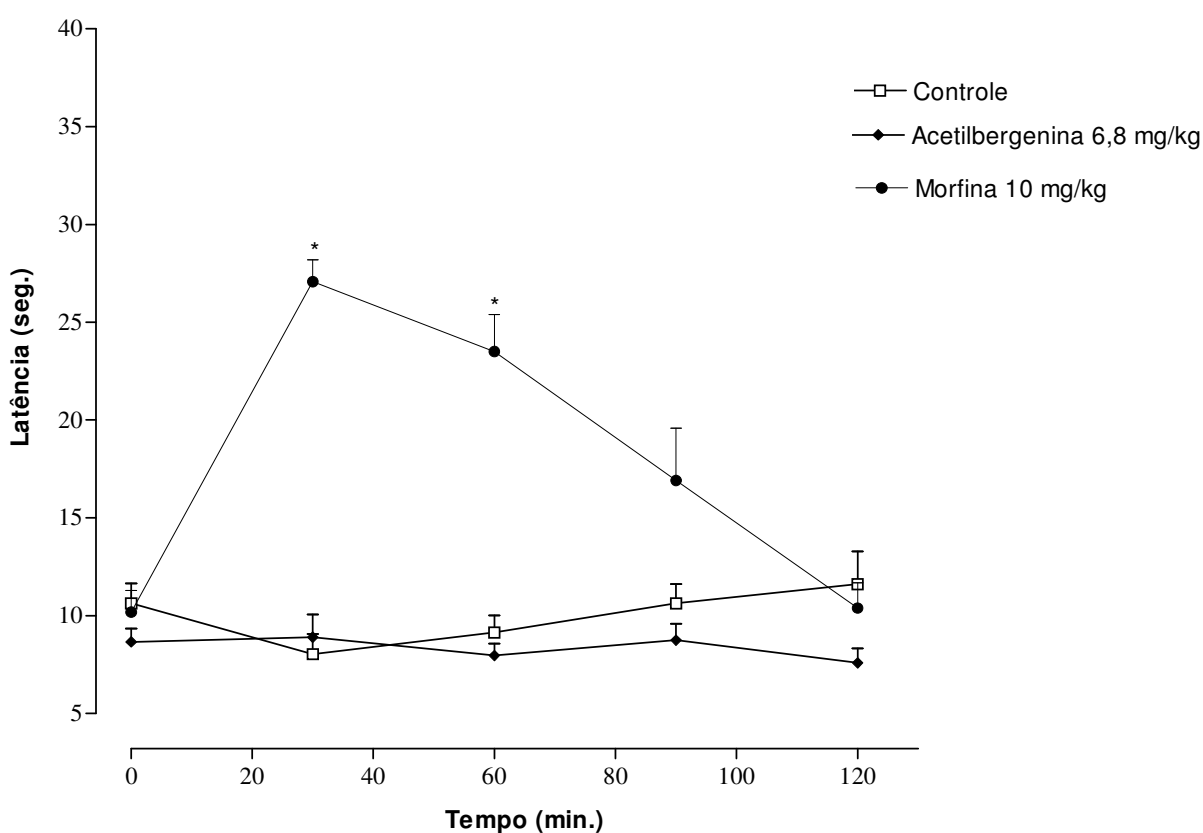
A administração oral de acetilbergenina nas doses de 1mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg e 25 mg/kg produziu efeito dose-dependente sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, onde o coeficiente de correlação foi de  $r=0,974$  ( $y= 32,678 + 2,533.X$ ) e a DE<sub>50</sub> encontrada 6,8 mg/kg (Figura 10).



**Figura 10-** Determinação da DE<sub>50</sub> através da regressão linear do efeito da administração de acetilbergenina (1, 5, 10, 15 e 25 mg/kg, v.o.) sobre as contorções induzidas por ácido acético 0,6% i.p. em grupos de 10 camundongos.  $r$ = coeficiente de correlação.

### 5.2.1.3 Teste da placa quente

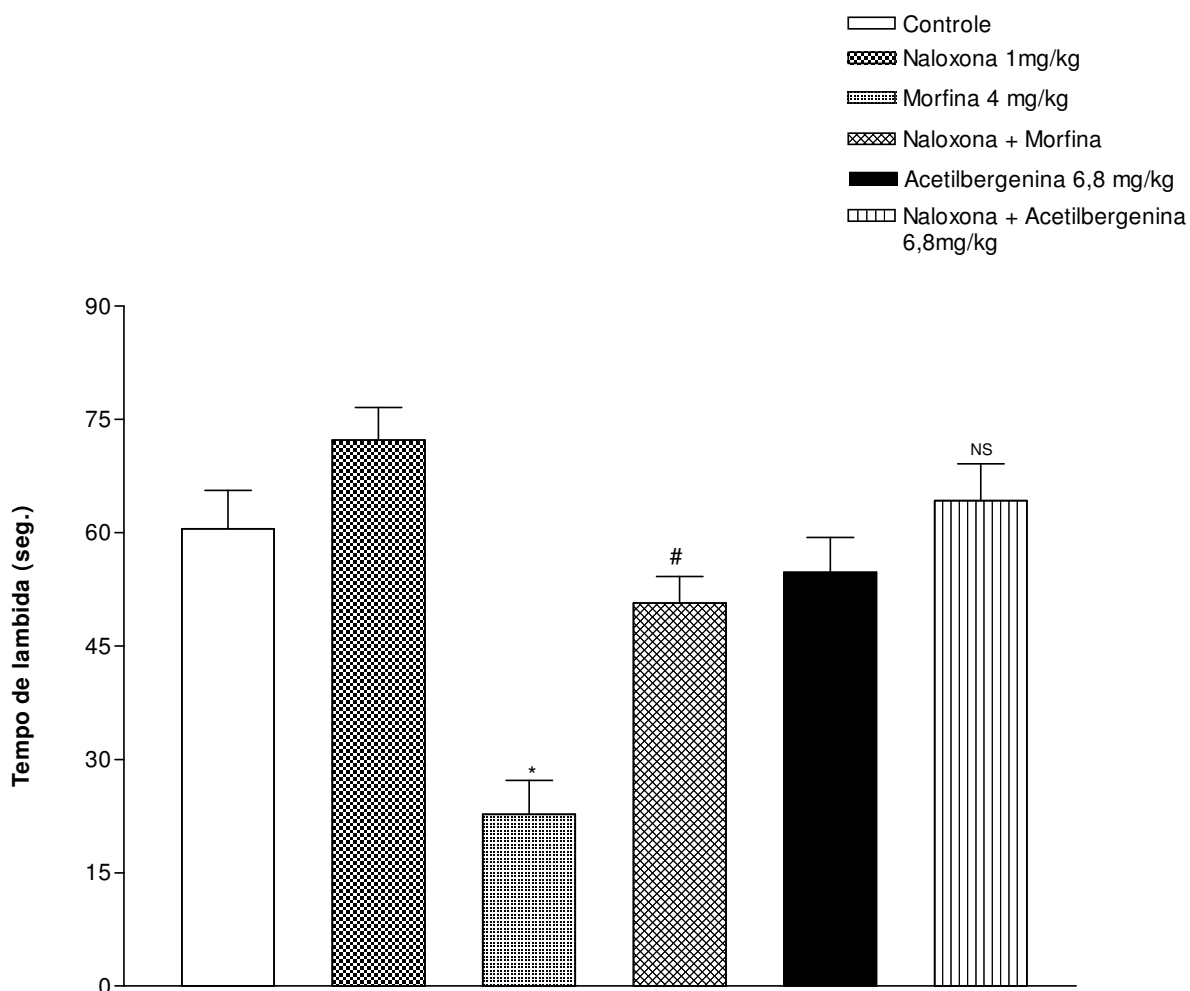
Os resultados apresentados na Figura 11 e na Tabela 7 mostram que o tratamento dos animais com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) não foi capaz de alterar o tempo de latência quando submetidos ao teste da placa quente à temperatura de 55 °C. Ao contrário, o tratamento com morfina (agonista opióide, 10 mg/kg, s.c.) causou significativo aumento da latência dos animais quando avaliada nesse modelo.



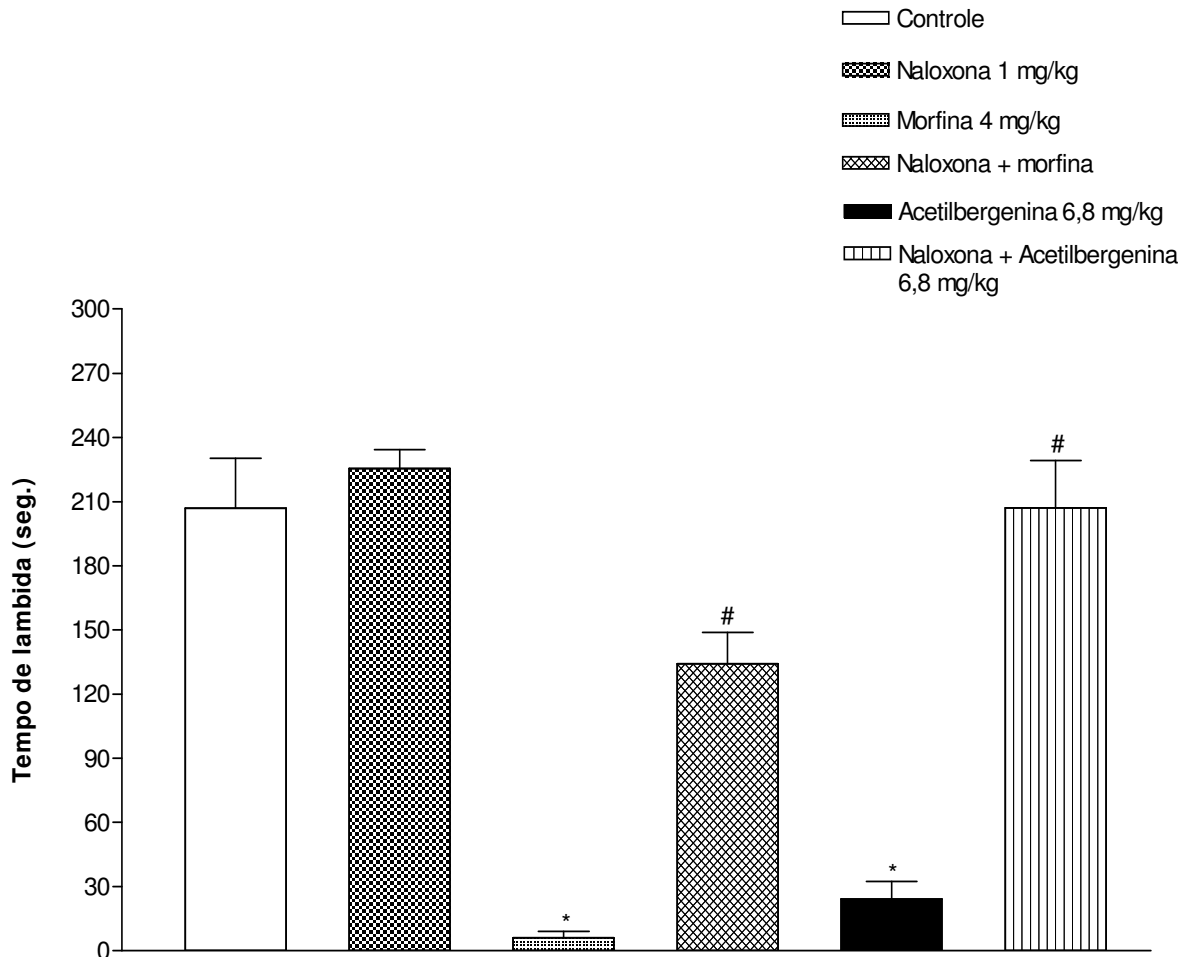
**Figura 11-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e da morfina (10 mg/kg, s.c.), sobre o tempo de latência no teste da placa quente à temperatura de 55 °C, em camundongos. Cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 10 animais.\* $P < 0,0001$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA, seguida do Teste de Student-Newman-Keuls).

#### 5.2.1.4 Teste de formalina

A administração oral de acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg não reduziu de forma significativa o tempo de lambida em relação ao grupo controle na 1ª fase do teste da formalina (fase neurogênica) (Figura 12), mas reduziu de maneira significativa o tempo de lambida em relação ao grupo controle na 2ª fase do teste da formalina (fase inflamatória) em 88,33% (Figura 13). A morfina (4 mg/kg), analgésico opióide, reduziu de maneira significativa as duas fases em 62,31% e 97,10%, respectivamente (Tabela 8). Neste teste, a naloxona (1 mg/kg) além de reverter o efeito de acetilbergenina na segunda fase, também foi capaz de reverter o efeito da morfina tanto na primeira fase quanto na segunda fase.



**Figura 12-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na primeira fase do teste. Cada grupo representa média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média), de 10 animais. \* $P < 0,0001$  quando comparado ao controle; # $P < 0,0001$  quando comparado ao agonista mais antagonista versus agonista; NS, estatisticamente não significativo quando comparado ao agonista mais antagonista versus agonista (Teste "t"-student).

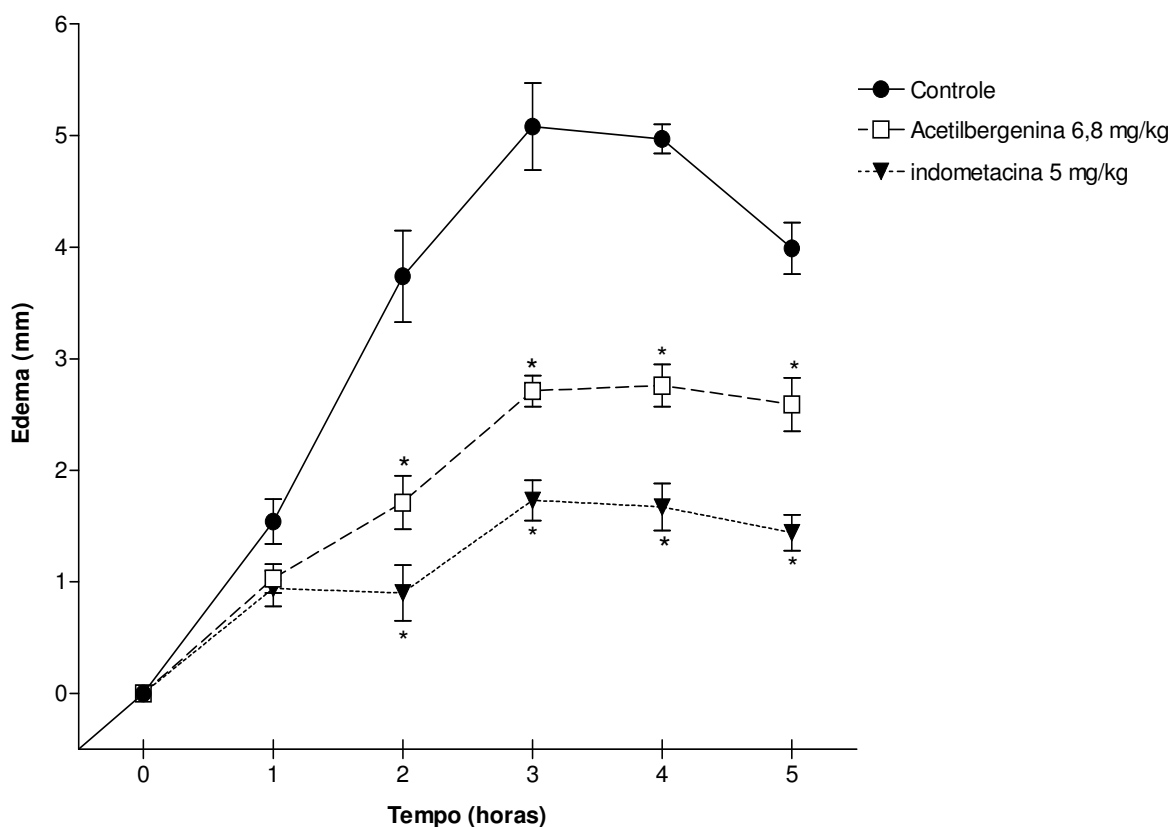


**Figura 13-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na segunda fase do teste. Cada grupo representa média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média), de 10 animais. \* $P < 0,0001$  quando comparado ao grupo controle; # $P < 0,0001$  quando comparado agonista mais antagonista versus agonista (Teste "t"-student).

## 5.2.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória de acetilbergenina *in vivo*

### 5.2.2.1 Edema de pata de rato por carragenina

O tratamento dos animais com acetilbergenina (6,8 mg/Kg; v.o) inibiu o edema de pata induzido pela carragenina nos tempos de 2, 3, 4 e 5 horas, em  $54,28 \pm 0,24$ ,  $47 \pm 0,14$ ,  $44,47 \pm 0,19$  e  $35,09 \pm 0,24\%$ , respectivamente. A resposta inibitória para o tratamento dos animais com a droga padrão indometacina (5 mg/Kg; v.o.) nos tempos de 2, 3, 4 e 5 horas foi,  $76,20 \pm 0,25$ ,  $66,00 \pm 0,18$ ,  $66,40 \pm 0,21$  e  $64,00 \pm 0,16\%$ , respectivamente (Figura 14 e Tabela 9).

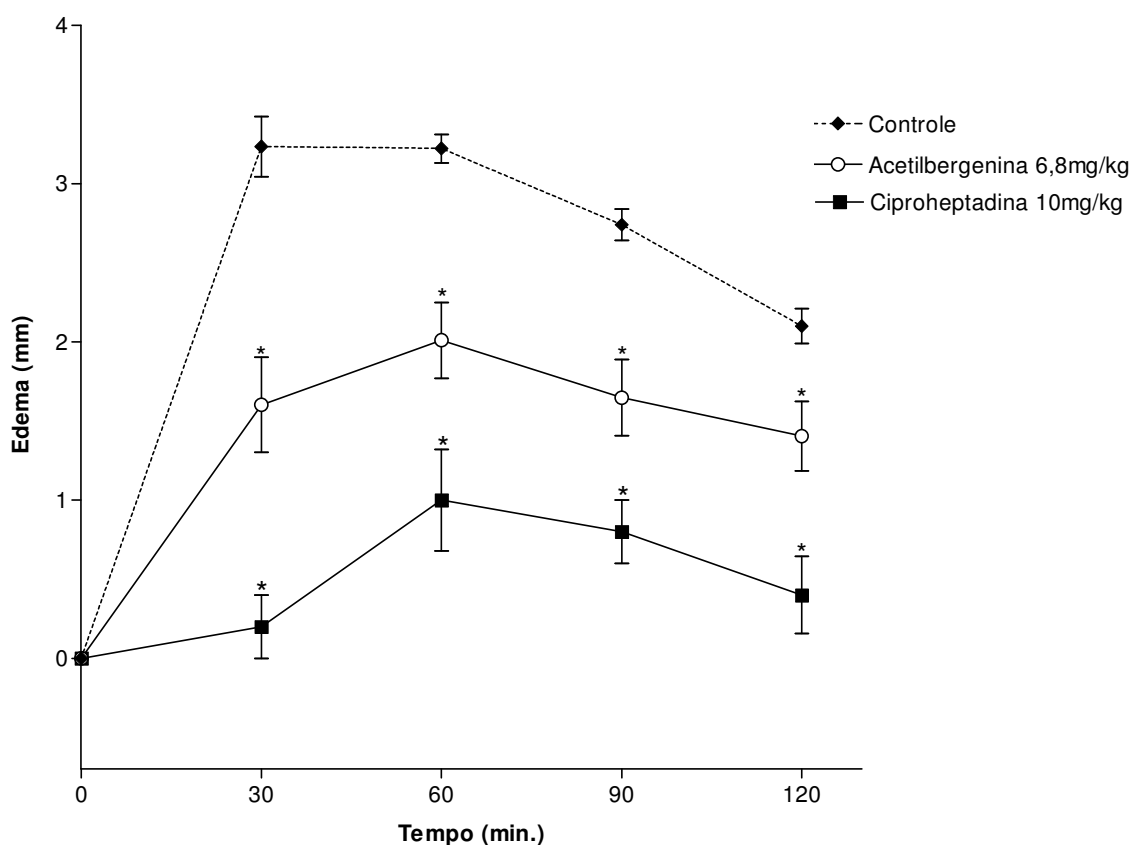


**Figura 14-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e indometacina (5 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (100  $\mu$ L/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle, teste "t" de Student.



### 5.2.2.2 Edema de pata de rato por dextrana

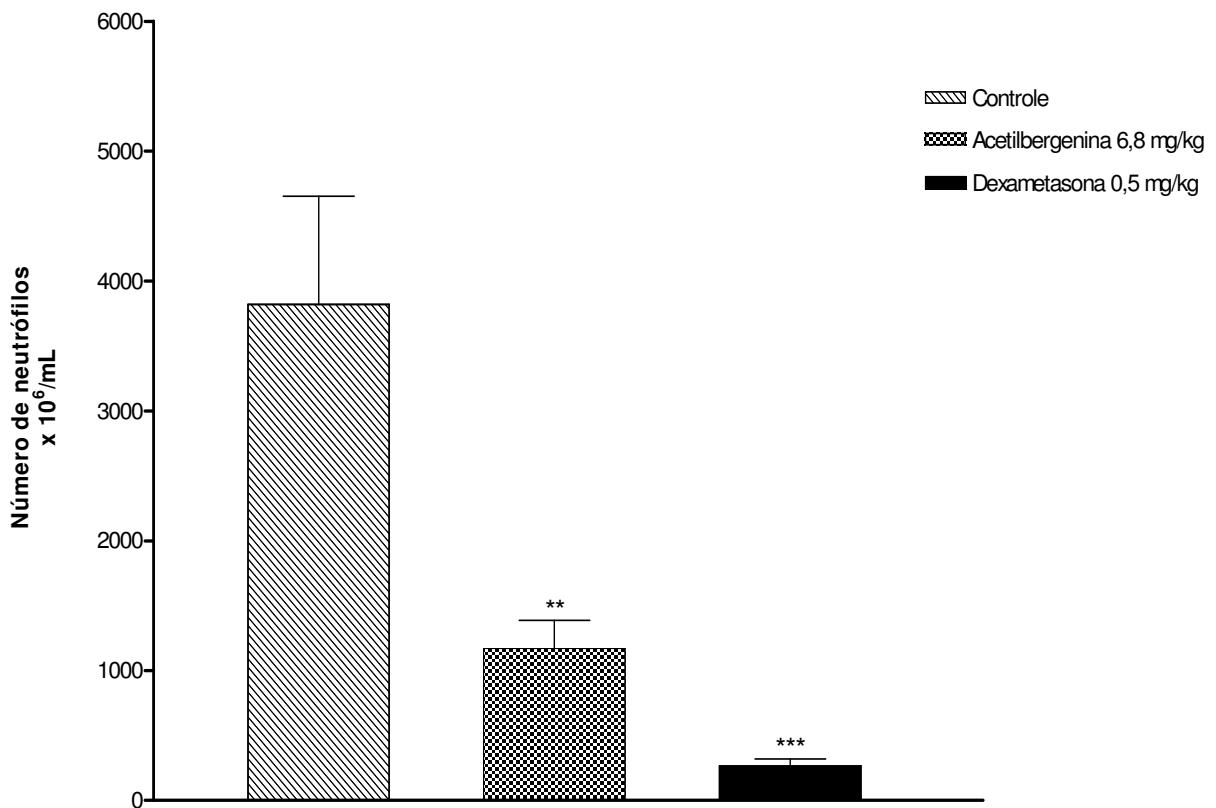
O tratamento dos animais com acetilbergenina (6,8 mg/Kg; v.o) inibiu o edema de pata induzido por dextrana nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, em  $50,46 \pm 0,30$ ,  $38,00 \pm 0,24$ ,  $40,15 \pm 0,24$  e  $33,33 \pm 0,22\%$ , respectivamente. A resposta inibitória para o tratamento dos animais com a droga padrão ciproheptadina (10 mg/Kg v.o) nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos foi,  $94,00 \pm 0,20$ ,  $69,04 \pm 0,32$ ,  $70,80 \pm 0,20$  e  $80,95 \pm 0,24\%$ , respectivamente, sendo significativa em todos os tempos (Figura 15 e Tabela 10).



**Figura 15-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) e ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por dextrana (100 µL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto representa média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais por grupo. \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle, teste "t" de Student.

### 5.2.2.3 Peritonite induzida por carragenina

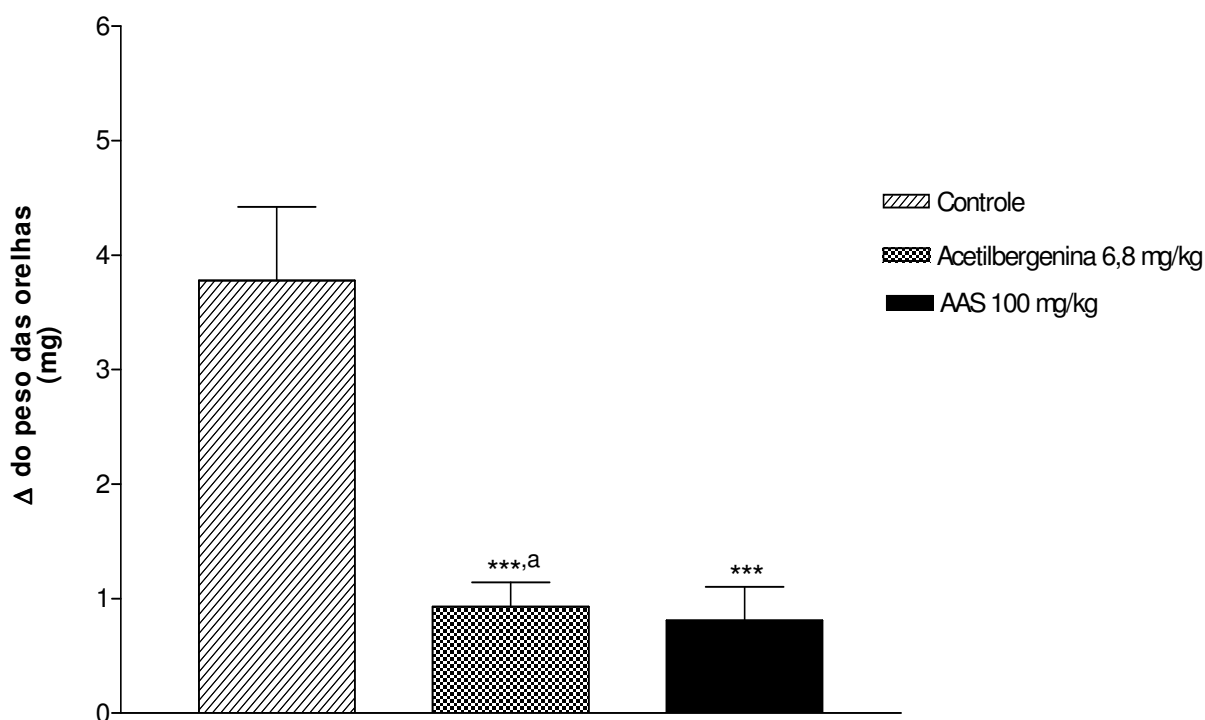
O tratamento dos animais com acetilbergenina (6,8 mg/Kg v.o.) foi capaz de inibir de maneira significativa o número de neutrófilos na peritonite induzido por carragenina, em 70,00% (Figura 16). Os animais tratados com a dexametasona (0,5 mg/Kg, v.o.) 30 minutos antes do experimento, apresentaram redução de 94,23% da migração celular. O número total de células residentes (basais) nos animais após 4 horas foi de  $3893,25 \pm 679,76 \times 10^6$  células/mL (Tabela 11).



**Figura 16-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg v.o.) e dexametasona (0,5 mg/kg v.o), sobre a migração de neutrófilos, para a cavidade peritoneal, induzida por 3mL de carragenina (100 µg/mL) em ratos. Cada barra representa a Média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos por grupo. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle (ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

#### 5.2.2.4 Dermatite induzida pelo óleo de cróton

O tratamento dos animais com acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg, v.o., provocou efeito inibitório significativo ( $p < 0,001$ ) quando comparado com grupo controle, inibindo o processo edematogênico em 75,60%. Efeito este semelhante ao observado com o grupo tratado com ácido acetilsalicílico que inibiu em 78,51% (Tabela 12). Os resultados obtidos demonstraram que não há diferença estatística entre o efeito anti-edematogênico de acetilbergenina e do agente anti-inflamatório, ácido acetilsalicílico, utilizado como controle positivo (Figura 17).



**Figura 17-** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg) e do ácido acetilsalicílico (AAS, 100 mg/kg), sobre a dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos. Cada coluna representa média  $\pm$  E.P.M. \*\*\* $P < 0,001$ , quando comparado ao grupo controle; <sup>a</sup> $P > 0,05$  quando comparado com AAS. ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

### 5.3 TESTE PARA AVALIAÇÃO DA POTÊNCIA EM RELAÇÃO À LESÃO GÁSTRICA (Lesões agudas induzidas por estresse)

O tratamento dos animais com indometacina (10 mg/ kg, v.o) produziu um maior número de lesões, quando comparado ao tratado com acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o). O grupo com acetilbergenina bloqueou em 78,55 % a geração de lesões gástricas por estresse quando comparado ao grupo indometacina (Tabela 13).

A severidade e o índice das lesões tipo 1+, 2+ e 3+ nos animais tratados com acetilbergenina e indometacina são apresentadas na Tabela 13. Acetilbergenina apresentou diferença significativa nos tipos de lesões 1+ (leves) e 3+ (severas com bordas hemorrágicas) em relação à indometacina.

**Tabela 13.** Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o), controle (solução de tween 2% + DMSO 2% em água destilada) e indometacina (10 mg/ kg, v.o), sobre a mucosa gástrica de ratos submetidos à restrição alimentar e estresse por imersão em água por 17 h.

Tratamento	n	Dose (mg/kg)	Tipos de lesões			Índice de úlcera	Efeito preventivo (%)
			1+	2+	3+		
Controle	5	-	0,6±1,34	0,4±0,89	0,6±0,40	3,2	-
Acetilbergenina	5	6,8	6,8±1,39	9,2±2,15	8,4±2,29	10,08	78,55***
Indometacina	5	10	16±3,50	13,6±5,73	32,6±5,73	47	-

\*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo tratado com indometacina, teste "t" de Student.

## 6. DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm sido aplicados à saúde humana há milhares de anos. Muitos medicamentos atualmente prescritos são diretamente isolados de plantas ou são artificialmente versões modificadas de produtos naturais. Atualmente os cientistas estão à procura de compostos com estruturas específicas que geralmente possam apresentar efeitos farmacológicos oriundos de fontes naturais (WANG; HAO; CHEN, 2007).

Com base nessa perspectiva decidiu-se estudar a planta *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec, da família Humiriaceae, popularmente conhecida como uxi e uchi-pucu, encontrada principalmente na Amazônia, Brasil (CUATRECASAS, 1961; SCHULTES, 1979). Na literatura foi constatado que as cascas do caule de *Endopleura uchi* são caracterizadas quimicamente pela presença de compostos metabólicos secundários como cumarinas, taninos e polifenóis (POLITI, 2009), o que reforçam os dados publicados por Luna et al.(2000). Das cascas desta planta foi isolada a bergenina, uma isocumarina pertencente à classe das cumarinas.

Embora um número considerável de estudos tenha comprovado que esse princípio ativo, bergenina, obtido desta espécie possui um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimicrobiana (SILVA et al., 2009), antiprotozoária (NYASSE et al., 2004), anticancerígena (CHEN et al., 2008), antioxidante (MADUKA et al., 2006), antiviral (PIACENTE et al., 1996), hepatoprotetora (LIM et al., 2000a), antiarrítmica (PU et al., 2002), gastroprotetora (GOEL et al., 1997), antitussígena (PIEGEN, 1981), neuroprotetora (TAKAHASHI et al., 2003) hipoglicêmica (JAHROMI et al., 1992) e anti-inflamatória (SWAMALAKSHMI et al., 1984; NUNOMURA et al., 2009). Visando torná-la mais lipofílica para potencializar suas atividades biológicas, a bergenina foi acetilada obtendo o derivado, acetilbergenina, em que até o momento sobre esta substância somente foi constatado na literatura sua atividade hepatoprotetora.

Em estudos de Lim et al (2000b) foi verificado que acetilbergenina possui maior atividade hepatoprotetora *in vivo* quando comparada a bergenina. Justificando que acetilbergenina por ser mais lipofílica possui maior facilidade em atravessar a bicamada lipídica das membranas celulares intestinais, o que resulta em um aumento de suas atividades biológicas.

Outros trabalhos realizados demonstraram a importância de adicionar um radical acetil a uma molécula para se ter atividade anti-edematogênica (CARVALHO e al., 1999), o que também já foi descrito por outros autores (KOROLKOVAS; BURCKHALTER, 1988). Isso pode ser parcialmente explicado pela alta especificidade de compostos anti-inflamatórios acetilados (SOUZA et al., 2004), como por exemplo, a aspirina, ao inibirem a síntese de PG mediante a inativação da COX. A aspirina acetila seletivamente o grupo hidroxila de um resíduo de Serina (Ser 530), entre os 70 aminoácidos terminais das cadeias da enzima PGEs. A acetilação conduz de forma não seletiva à inibição irreversível das isoenzimas (COX-1 e COX-2) (WALLACE, 2008). A maioria dos AINEs age de forma reversível e não seletiva sobre as enzimas (MONTEIRO et al., 2008).

Desse modo, a possibilidade de obtenção do derivado a partir de uma isocumarina- a bergenina- a sugestão de acetilação da bergenina para aumentar sua atividade biológica e, somando-se a escassez de atividades biológicas relatadas à acetilbergenina, despertou o interesse em investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de acetilbergenina em diferentes modelos experimentais *in vivo*.

É sabido que milhares de plantas existentes na natureza têm constituído um enorme reservatório de moléculas bioativas que podem ser desenvolvidas como novas entidades químicas, análogos, derivados, compostos sintéticos a partir de um produto natural (RASTOGI; RAWAT, 2008). Todavia, a identificação da entidade química é uma das exigências para que depois essas substâncias possam ser avaliadas em modelos experimentais.

Desse modo, a priori, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da bergenina (DMSO- $d_6$ , 300 MHz, Figura 18, página 103), apresentou um sinal simpleto em  $\delta$  6,98 (1H, s) devido ao hidrogênio aromático H-4, um sinal simpleto em  $\delta$  3,77 (3H, s) referente à metoxila aromática MeO-15, um duplete em  $\delta$  4,97 (1H, *d*, 10,5 Hz) referente ao hidrogênio benzílico H-9, além de sinais típicos do C-glicosídeo, como o tripleto largo em  $\delta$  3,99 (1H, *tl*, J=9,6 Hz) devido ao hidrogênio H-14, o duplete largo em  $\delta$  3,85 (1H, *dl*, J=11,1 Hz) referente ao hidrogênio H-16a, o multiplete  $\delta$  3,65 (1H, *m*) pertencente ao H-13, o tripleto largo em  $\delta$  3,57 (1H, *tl*, 8,4 Hz) devido ao hidrogênio H-11, o multiplete em  $\delta$  3,42 (1H, *m*) devido ao hidrogênio H-16b e o tripleto de duplete em  $\delta$  3,20 (1H, *td*, J=4,8 e 12,9 MHz) referente ao hidrogênio H-12. O espectro apresentou ainda, sinais relativos a hidrogênios fenólicos a  $\delta$  9,76 (provavelmente da hidroxila OH-7 devido estar em posição orto-dissubstituída) e a

8,45 (OH-5), e alifáticos a  $\delta$  5,65 (OH-13),  $\delta$  5,43 (OH-12) e  $\delta$  4,92 (OH-16). As figuras 19 e 20 mostram a expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da bergenina, que auxilia na interpretação dos sinais.

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (figura 21, página 106) da bergenina mostrou o acoplamento do hidrogênio metínico H-9 em  $\delta$  4,97 com o hidrogênio H-14 em  $\delta$  3,99 e desse último com o hidrogênio oximetínico H-13 em  $\delta$  3,65. O espectro mostrou ainda, os seguintes acoplamentos: H-16a em  $\delta$  3,85 com H-16b em  $\delta$  3,42; H-12 em  $\delta$  3,20 com H-11 em  $\delta$  3,57 e com H-13 em  $\delta$  3,65, além dos acoplamentos dos hidrogênios das hidroxilas alifáticas OH-12 em  $\delta$  5,43 com H-12 em  $\delta$  3,20 e OH-13 em  $\delta$  5,65 com H-13 em  $\delta$  3,65. Embora não muito comum, o acoplamento de hidrogênios de hidroxilas alcoólicas é previsto quando é utilizado DMSO- $d_6$  como solvente (SILVERSTAIN et al., 2007).

As multiplicidades dos sinais de carbono da bergenina foram observadas pela análise do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  135 $^\circ$  (Figura 23, página 108) que indicou a presença de seis carbonos CH, um  $\text{CH}_2$  e um  $\text{CH}_3$ , e por exclusão os seis carbonos não hidrogenados.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 22, página 107) da bergenina evidenciou a presença de 14 carbonos, entre os quais o sinal relativo à carbonila em  $\delta$  163,5 (C-2), o grupo hidroximetileno em  $\delta$  61,2 (C-16) característico de açúcares e o sinal em  $\delta$  59,9 (OMe-15) referente à metoxila aromática. Os demais carbonos tiveram as seguintes atribuições:  $\delta$  109,5 (C-4),  $\delta$  140,7 (C-6),  $\delta$  109,5 (C-5),  $\delta$  116,0 (C-8),  $\delta$  148,2 (C-7),  $\delta$  118,2 (C-3),  $\delta$  70,8 (C-11),  $\delta$  79,9 (C-14),  $\delta$  73,8 (C-13),  $\delta$  81,8 (C-9) e  $\delta$  72,2 (C-12). Os dados espectrométricos da substância isolada neste trabalho estão de acordo com os dados relatados na literatura para a substância bergenina **S**<sub>1</sub> (RAMAIAH et al., 1979).

Em relação ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  de acetilbergenina ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz, Figura 24, página 109), embora obtido em solvente diferente, mostrou como esperado, a desproteção dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos que sustentam o grupo acetil, quando comparados com os sinais desses hidrogênios na bergenina. O espectro apresentou um sinal de hidrogênio aromático em  $\delta$  7,75 (1H, s) devido ao hidrogênio aromático H-4, um sinal simpleto em  $\delta$  3,89 (3H, s) referente à metoxila aromática MeO-15, um duplete em  $\delta$  4,80 (1H, *d*, 10,8 Hz) referente ao hidrogênio benzílico H-9, além de sinais típicos do C-glicosídeo, como o sinal tripleto largo em  $\delta$  5,46 (1H, *tl*, 9,9 Hz) pertencente ao H-13, o tripleto largo em 5,11 (1H, *tl*,

9,9 Hz) referente ao hidrogênio H-12, o tripleto largo em  $\delta$  4,34 (1H, *tl*, 10,2 Hz) devido ao hidrogênio H-14, o duplo duplete em  $\delta$  4,29 (1H, *dd*,  $J=12,9$  e  $2,1$  Hz) referente ao hidrogênio H-16a, o duplo duplete em  $\delta$  4,13 (1H, *dd*,  $12,9$  e  $3,9$  Hz) devido ao hidrogênio H-16b e o duplo duplo duplete em  $\delta$  3,80 (1H, *ddd*,  $12,9$ ;  $3,9$  e  $2,1$  Hz) devido ao hidrogênio H-11. O espectro apresentou ainda sinais relativos aos hidrogênios das metilas de cinco grupos acetatos (OAc) em  $\delta$  2,33,  $\delta$  2,32,  $\delta$  2,09,  $\delta$  2,08 e  $\delta$  2,05. As figuras 25 e 26 mostram a expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetilbergenina, que auxilia na interpretação dos sinais.

O espectro de COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (figura 27, página 112) de acetilbergenina (**S<sub>5</sub>**) e sua expansão (figura 28, página 113) mostraram o acoplamento do hidrogênio benzílico H-9 em  $\delta$  4,80 com o hidrogênio H-14 em  $\delta$  4,34 e desse último com o hidrogênio oximetínico H-13 em  $\delta$  5,46. O espectro mostrou, ainda, os seguintes acoplamentos: H-16a em  $\delta$  4,29 com H-16b em  $\delta$  4,13 e com H-11 em  $\delta$  3,80; H-12 em  $\delta$  5,11 com H-11 em  $\delta$  3,80 e com H-13 em  $\delta$  5,46.

As multiplicidades dos sinais de carbono de acetilbergenina (**S<sub>5</sub>**) foram observadas pela análise do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  135 $^\circ$  (Figura 31 e 32, páginas 116 e 117) que indicou a presença de seis carbonos CH, um CH<sub>2</sub> e um CH<sub>3</sub>, e por exclusão os seis carbonos não hidrogenados do esqueleto da bergenina, mais os dez carbonos dos cinco grupos acetil.

A estrutura química de acetilbergenina apresenta 24 átomos de carbonos, entretanto, seu espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 29, página 114) mostrou a presença de apenas 21 sinais de carbonos, evidenciando que a estrutura apresenta carbonos equivalentes. No espectro são observados, entre outros, os sinais relativos à carbonila em  $\delta$  161,56 (C-2), o grupo hidroximetileno em  $\delta$  61,72 (C-16) característico de açúcares e o sinal em  $\delta$  61,44 (C-15) referente à metoxila aromática. Os demais carbonos tiveram as seguintes atribuições:  $\delta$  123,96 (C-4),  $\delta$  149,95 (C-6),  $\delta$  144,10 (C-5),  $\delta$  129,45 (C-8),  $\delta$  141,23 (C-7),  $\delta$  118,55 (C-3),  $\delta$  68,12 (C-11),  $\delta$  76,57 (C-14),  $\delta$  72,77 (C-13),  $\delta$  76,57 (C-9) e  $\delta$  72,05 (C-12). O espectro apresentou ainda dois sinais relativos aos hidrogênios das metoxilas de cinco grupos acetatos (OC-**OCH<sub>3</sub>**), em  $\delta$  20,54 referentes as três metoxilas dos grupos acetatos da porção alifática e em  $\delta$  20,69 referentes as duas metoxilas da porção aromática, além de cinco sinais referentes aos carbonos carbonílicos dos cinco grupos acetatos (**O=C-OCH<sub>3</sub>**), em  $\delta$  167,62 e  $\delta$  168,23 relativos às metoxilas da porção aromática e em  $\delta$  169,61,  $\delta$  169,99 e  $\delta$  170,46 referentes às metoxilas da porção alifática.



A expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 30, página 115) auxiliou na atribuição dos sinais de carbono. Os dados espectrométricos de acetilbergenina ( $S_5$ ) estão de acordo com os dados da literatura para essa substância (RAMAIAH, et al., 1979).

Os dados dos espectros da bergenina e de acetilbergenina mostraram-se de acordo com aqueles obtidos por RAMAIAH et al. (1979) e MAGALHÃES et al. (2007), o que possibilitou em seguida, avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de acetilbergenina. Considerando a relação entre os efeitos analgésicos e os efeitos anti-inflamatórios, inicialmente foi testada a atividade antinociceptiva de acetilbergenina em modelos de nocicepção periférica e central. Entre os modelos de nocicepção, destaca-se o de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Collier et al. (1968) postularam que o ácido acético age indiretamente induzindo a liberação de mediadores endógenos da dor, sensíveis aos anti-inflamatórios não esteroidais e aos opióides.

A indução dessas contorções abdominais ocorre em decorrência à uma reação inflamatória aguda relacionada com aumento dos níveis de  $\text{PGE}_{2\alpha}$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , em fluídos peritoneal, bem como de produtos da lipoxigenase (DERAEDT et al., 1980; VERMA et al., 2005). Todavia, verificou-se que a administração intraperitoneal de ácido acético não só induz a liberação de prostaglandinas, mas também de histamina, serotonina e bradicinina (WHITTLE, 1964; BASTOS et al., 2001). Além disso, macrófagos e basófilos, existentes na cavidade abdominal, sob ação do ácido acético, podem liberar citocinas, como IL-8, IL- $1\beta$  e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO et al., 2000), as quais estimulam neurônios aferentes primários, aumentando a liberação de aspartato e glutamato no fluido cerebrospinal (FENG et al., 2003), o que explica a ocorrência da nocicepção característica, observada nesse modelo.

Utilizando esse teste foi possível demonstrar que a administração oral de acetilbergenina nas doses de 1 mg/kg até 25 mg/kg, bloqueou a geração das contorções de forma significativa e dose-dependente, quando comparada ao grupo controle. Demonstrou ainda, que a dose de 25 mg/kg, v.o., foi mais efetiva do que a indometacina (5 mg/kg) (Figura 9). A partir do modelo de contorções abdominais foi possível determinar a  $\text{DE}_{50}$  (6,8 mg/kg) (Figura 10).

Alves et al. (2009a) avaliaram preliminarmente o efeito da bergenina (25, 50 e 100 mg/kg, i.p) sobre às contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (0,8%), e verificaram que o efeito da bergenina foi significativo somente nas doses de 50 e

100 mg/kg. Este resultado permite sugerir que acetilbergenina demonstrou ser mais potente, ainda que administrada por via oral, quando comparada a bergenina.

Os AINEs inibem a ciclooxigenase em tecidos periféricos, reduzindo assim a síntese de PGE<sub>2</sub> e interferindo no mecanismo de transdução de nociceptores aferentes primários (DIONNE et al., 2001). Desta forma, embora o teste de contorções abdominais seja um modelo relativamente simples e com pouca especificidade (COLLIER et al., 1968), sendo necessário realizar outros ensaios para confirmar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de acetilbergenina, o teste torna-se útil para avaliar a analgesia moderada produzida por compostos anti-inflamatórios (FERREIRA; VANE, 1974).

O modelo da placa quente, descrito inicialmente, por Woolfe e MacDonald (1944) e posteriormente modificado por Eddy e Leimback (1953), é conhecido por ser muito sensível às drogas analgésicas que possuem ação no SNC (MEKONNEN et al, 2009). No teste da placa quente um estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação nociceptiva aguda ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente aos centros corticais produzindo uma resposta nociceptiva organizada (PEREIRA, 2005; MILANO, 2008; MEKONNEN et al, 2009).

Neste modelo, acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg, v.o., não causou aumento da resposta à latência em animais submetidos à temperatura de 55 °C (Figura 11). Este teste foi utilizado para avaliar a participação de mecanismos centrais na antinocicepção promovida pela acetilbergenina verificada no teste de contorções abdominais, uma vez que este é um modelo inespecífico que detecta tanto drogas de efeito central quanto periférico. No entanto, como o pré-tratamento de acetilbergenina não modificou a reatividade dos animais ao estímulo térmico, é provável que não haja participação de mecanismos centrais na atividade analgésica desse derivado.

Diferentemente da ação analgésica central, o efeito analgésico periférico pode ser mediado através da inibição da ciclooxigenases e/ou lipoxigenases (e outros mediadores inflamatórios). Essa hipótese é consistente com os estudos de Eddy e Leimback (1953) e Koster et al. (1959), que postularam que o teste da placa quente e o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético são técnicas úteis para a avaliação de drogas analgésicas de ação central e periférica, respectivamente. Assim foi observado que acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg mostrou um efeito analgésico significativo quando comparada com o grupo controle

na indução do ácido acético, mas nenhum efeito no modelo de placa quente. Estes resultados sugerem que acetilbergenina possui efeito analgésico periférico.

O teste da formalina é considerado um modelo para a dor crônica (DUBUISSON; DENNIS, 1977; FERREIRA et al., 2004). Neste teste, os animais apresentam duas fases distintas de comportamento nociceptivo, o que provavelmente envolve diferentes estímulos. A primeira fase (neurogênica) inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, estendendo-se pelos primeiros 5 minutos e resulta da estimulação química direta dos nociceptores, predominantemente das fibras C (SULAIMAN et al., 2008), sendo associada à liberação de aminoácidos excitatórios como óxido nítrico, substância P, glutamato, entre outros (OMOTE et al., 1998; FERREIRA et al., 2004).

Por outro lado, a liberação de mediadores nociceptivos, durante a primeira fase do teste da formalina, causa extravasamento plasmático, vasodilatação de capilares vizinhos, ativação de fibras simpáticas, de mastócitos e de macrófagos. Este processo também induz a liberação de mais mediadores do processo inflamatório, tais como, como histamina, 5-HT, bradicinina e prostaglandinas (FERREIRA et al., 2004). Este conjunto de mediadores inflamatórios produz sensibilização das vias periféricas e centrais de condução da dor, característica da segunda fase (fase inflamatória), observada de quinze a trinta minutos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992).

Drogas que atuam periféricamente, como esteróides (hidrocortisona, dexametasona) e AINEs (aspirina), inibem principalmente a segunda fase (CHEN et al., 2008a), sendo assim, a inibição apenas da segunda fase do teste da formalina é uma característica típica dos inibidores da ciclooxigenase (ROSLAND et al., 1990). Observou-se que acetilbergenina, na dose de 6,8 mg/kg mostrou ser significativa na segunda fase quando comparada com o grupo controle, indicando uma ação relacionada ao processo inflamatório, cuja inibição foi de 88,33% (Figura 13).

Os opióides como a morfina regulam a transmissão nociceptiva através de duas ações inibitórias: uma inibição pós-sináptica, produzida parcialmente aumentando a condutância de  $K^+$ , e a inibição pré-sináptica da liberação de glutamato, substância P e outros transmissores dos terminais de neurônios sensoriais (KANDEL et al., 2000; FERREIRA; FACCIONE, 2005). Estudos realizados por Hunskaar e Hole (1987) mostraram que a morfina, assim como codeína, exemplos de analgésicos centrais, exercem efeitos em ambas as fases do teste da

formalina. De acordo com a literatura, a morfina foi utilizada no teste da formalina como droga padrão e produziu significativo efeito antinociceptivo em relação ao grupo controle, em ambas as fases do teste (Figuras 12 e 13).

Para a investigação de um possível envolvimento do sistema opióide na atividade analgésica de acetilbergenina foram utilizados morfina, (4 mg/kg, s.c.), um conhecido agonista dos receptores opióides e naloxona (1,0 mg/kg, i.p.), um antagonista não-seletivo de receptores opióides. Em alguns modelos experimentais, a ação da naloxona é de antagonizar opióides endógenos envolvidos na dor ou estresse (BISPO et al., 2001). Os resultados obtidos indicam que o pré-tratamento com naloxona reverteu de modo significativo os efeitos antinociceptivos de acetilbergenina (6,8 mg/kg) na segunda fase (Figura 13) e, da morfina (4 mg/kg), em ambas as fases (Figuras 12 e 13). Portanto, estes resultados sugerem que os receptores opióides estão envolvidos na ação antinociceptiva de acetilbergenina.

Modelos experimentais usando a carragenina como agente inflamatório são amplamente utilizados para investigação da fisiopatologia da resposta inflamatória, como também para a caracterização de novas drogas anti-inflamatórias (WINTER et al., 1962; TOBACMAN, 2001). O edema de pata induzido por carragenina foi utilizado neste trabalho a fim de avaliar a atividade anti-inflamatória de acetilbergenina.

A carragenina, polissacarídeo sulfatado, é um agente flogístico que desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia que se caracteriza por edema, exacerbada sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos em função de uma ação seqüencial de vários mediadores (histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), cininas, prostaglandinas), incluindo o sistema de complemento (FERREIRA et al., 2004). Nesse modelo pode ocorrer elevação dos níveis de COX-2, com um aumento concomitante da produção de prostaglandinas (NANTEL et al., 1999).

A resposta vascular aguda induzida por carragenina envolve três etapas distintas, de acordo com os mediadores liberados. Na etapa inicial, nos primeiros 90 minutos, ocorre a liberação concomitante de histamina e 5-HT, a segunda etapa, que ocorre entre 90 e 150 minutos é desencadeada por cininas, enquanto na terceira etapa que começa a partir de 150 minutos, ocorre a liberação de prostaglandinas com um pico máximo na terceira hora. Todos esses mediadores são dependentes do sistema complemento. Histamina e 5-HT são responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na fase inicial do processo inflamatório.

Bradicinina tem a capacidade de induzir um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos. E na terceira fase observa-se a ocorrência de infiltração maciça de leucócitos polimorfonucleares (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971).

Em relação ao efeito de acetilbergenina sobre o edema, os dados apresentados neste estudo demonstraram que o pré-tratamento dos animais com acetilbergenina na dose 6,8 mg/kg, 1h antes da injeção intraplantar de carragenina, reduziu o desenvolvimento do edema de pata da 2ª à 5ª hora, porém essa inibição foi maior no segundo e terceiro pico (2ª e 3ª h) (Figura 14), o que vale ressaltar que na terceira hora, há participação de PGEs. Segundo DI ROSA et al. (1971) para que haja uma redução do edema induzido por carragenina entre os tempos (0-90 min) é necessário a administração de um antagonista de receptores histaminérgicos mais um antagonista de receptores serotoninérgicos, o que explica o fato de acetilbergenina não produzir efeito inibitório sobre o edema induzido por carragenina nesse intervalo de tempo. Ainda nesse modelo, a indometacina (5 mg/kg, v.o.), considerada um inibidor da ciclooxigenase, também reduziu significativamente o volume do edema de pata induzido por carragenina em todos os tempos estudados. Para demonstrar a participação de prostaglandinas no edema induzido por carragenina, alguns autores comprovaram que o pré-tratamento com aspirina, fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, promovia redução de prostaglandinas endógenas e diminuição do edema; em contrapartida, a administração de altas doses de PGE<sub>2</sub> exógena ou prostaciclina desencadeava um aumento do edema de pata (LEWIS et al., 1975; VANE; BOTTING, 1987).

Outro agente flogístico utilizado no presente estudo foi a dextrana. Carragenina e dextrana induzem o edema de pata por mecanismos diferentes. Como já relatado, enquanto a carragenina induz a formação de um exsudato rico em proteínas contendo grande número de neutrófilos, a dextrana é um polissacarídeo de alto peso molecular que induz uma reação anafilática, caracterizada pelo extravasamento e formação do edema com pouca proteína e poucos neutrófilos, além da desgranulação de mastócitos e subsequente liberação de histamina e serotonina (VINEGAR et al., 1969; METCALFE et al., 1997; FERNÁNDEZ et al., 2001). Eles interagem com seus respectivos receptores (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e 5HT<sub>2</sub>) residentes no endotélio dos micro-vasos (ROOME et al., 2008). Neste modelo foi observado que acetilbergenina promoveu redução em todos os tempos (0-120 min) no edema de pata induzido por dextrana (Figura 15). Apesar de acetilbergenina não ter tido um

efeito inibitório sobre o edema pata induzido por carragenina entre os tempos de 0-90 minutos, foi demonstrado que acetilbergenina foi capaz de promover redução do edema induzido por dextrana, o que é possível sugerir que acetilbergenina atue inibindo a liberação de serotonina ou de histamina dos mastócitos, ou atue bloqueando receptores serotoninérgicos ou histaminérgicos. A ciproheptadina, um antagonista H<sub>1</sub> e 5-HT, também foi capaz de reduzir significativamente o edema de pata induzido por dextrana em todos os tempos (Figura 15).

Esses resultados estão de acordo com Swarnalakshmi et al. (1984) que reportaram a atividade anti-edematogênica da bergenia, apresentando inibição dose dependente na terceira hora, em 44,1, 53,6 e 65,5 % nas doses de 60, 120, 240 mg/kg por via oral, respectivamente. Entretanto, diante destes dados é possível verificar que acetilbergenina, na dose de 6,8 mg/kg por via oral foi mais potente, uma vez que nessa dose foi capaz de inibir em 47% o edema induzido por carragenina na terceira hora.

A atividade de acetilbergenina sobre a migração leucocitária foi estudada no modelo da peritonite induzida por carragenina em ratos. Este modelo de inflamação aguda permite a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal sob a ação de agentes quimiotáticos, principalmente leucotrienos LTB<sub>4</sub> (BASTOS et al., 2001). Vários autores têm amplamente demonstrado que o recrutamento de células durante a inflamação depende da liberação de mediadores locais, que são responsáveis por alterações vasculares e teciduais no local, bem como pelo recrutamento de células de defesa (THOMAZZI et al., 2009).

Ressalta-se também que os neutrófilos são os principais subtipos de leucócitos que participam na defesa do organismo, e sua migração dos vasos sangüíneos aos tecidos é um processo crucial na resposta contra infecções causadas por microorganismos. Essa infiltração de neutrófilos para o local da área inflamada agrava a reação inflamatória produzindo quantidades excessivas de enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, eicosanóides e citocinas, causando danos aos tecidos (ROOME et al., 2008; ALVES et al., 2009b). Assim, é evidente que a inibição do trânsito de leucócitos é uma estratégia muito eficaz para tratar doenças inflamatórias (ALVES et al., 2009b).

Desse modo, considerando que os neutrófilos são as células responsáveis pela defesa inicial diante de agentes exógenos, o aumento numérico destes corresponde uma resposta ao estímulo promovido pela administração do agente

flogístico, como a carragenina. O mecanismo de ação da carragenina em induzir a migração leucocitária pode ser por sinergismo entre prostaglandinas ( $PGE_2$ ),  $LTB_4$  e outros potentes agentes quimiotáticos, como complemento (C5a) e interleucinas (IL-8), promovendo vasodilatação, exsudação plasmática e acúmulo de leucócitos nos locais da lesão (THOMAZZI et al., 2009; RUANGSANG; TEWTRAKUL; REANMONGKOL, 2010). É possível então que os AINEs, ao inibirem a síntese de prostaglandinas vasodilatadoras ( $PGE_2$ ) promovam redução do fluxo sanguíneo comprometendo a migração leucocitária para a área inflamatória (VINEGAR et al., 1973; ALMEIDA et al., 1980).

Desta forma, usando carragenina como estímulo neste trabalho, foi possível produzir uma resposta inflamatória aguda no interior da cavidade peritoneal de ratos 4 horas mais tarde, com um grande número de células polimorfonucleares no exsudato peritoneal (NETO et al., 2005) como observado com o grupo controle (Figura 16). Por outro lado, a administração oral de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) inibiu a migração celular de neutrófilos em 70%, seguindo o perfil semelhante ao da dexametasona que inibiu em 94, 23%.

O  $LTB_4$  é um potente agente quimiotático para os leucócitos polimorfonucleares e lipoxigenases, estas por sua vez, são enzimas responsáveis pela síntese de leucotrienos, sendo muito sensível a anti-inflamatórios esteroidais, como a dexametasona (NETO et al., 2005). Dessa forma, verifica-se que o efeito anti-edematogênico promovido pela acetilbergenina quando comparado com o grupo controle, mostrou uma correlação com sua capacidade de diminuir o número de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal.

No teste da dermatite induzida pela aplicação tópica de óleo de cróton ocorre a ativação da fosfolipase  $A_2$ , liberando ácido araquidônico com conseqüente biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas, pelas vias ciclooxigenase e lipoxigenase, respectivamente. O efeito edematogênico deste agente flogístico é devido à presença no óleo de cróton, do composto chamado 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), uma espécie de éster de forbol que age diretamente estimulando proteínas quinase C que parecem estar envolvidas na ativação celular via fosforilação da proteína, desencadeando todo processo descrito acima (MIÑO et al., 2004; RANG et al., 2007, p.39; REANMONGKOL et al., 2009). Em adição a essas informações, McAdam et al. (1999) descreveram que os ésteres de forbol são um dos estimulantes que promovem a indução de COX-2 e que por outro lado, a

expressão desta isoforma pode ser inibida por glicocorticóides e por citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4. Estas informações levaram à hipótese de que a expressão de COX-2 seja reforçada com a liberação de prostaglandinas, característica de uma resposta inflamatória.

Em síntese, o óleo de cróton por ser um irritante vascular, causa infiltração leucocitária de polimorfonucleares, edema intracelular e dermatite tópica. Esta dermatite é sensível à ação de anti-inflamatórios de uso tópico, respondendo também à administração sistêmica de anti-inflamatórios esteroidais (TUBARO, 1986; SEGURA, 1998). Neste ensaio foi utilizado como controle positivo, o ácido acetilsalicílico na dose de 100 mg/kg, v.o, o qual inibiu de modo significativo a dermatite. Acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg, v.o., que também inibiu significativamente a dermatite (75,60%) apresentou resultado semelhante ao anti-inflamatório não-esteroidal, cuja inibição foi de 78,51% (Figura 17 e Tabela 12).

Estes resultados mostram que acetilbergenina tem comprovada propriedade antiedematogênica/ anti-inflamatória pela inibição significativa do edema agudo nos dois modelos usados. O edema de orelha induzido por óleo de cróton representa um modelo muito usado para estudar atividade anti-inflamatória de drogas esteroidais e não esteroidais (TUBARO et al., 1986; COSTA et al., 2007), assim como o edema de pata induzido por carragenina.

A enzima PLA<sub>2</sub>, além das enzimas COX-1 e COX-2 são consideradas como importantes alvos terapêuticos no processo de descobrimento de novas drogas anti-inflamatórias associadas com a biossíntese das prostaglandinas. Nunomoura et al. (2009) verificaram que a bergenina *in vitro* demonstrou pouca atividade frente a enzima PLA<sub>2</sub>, sendo que também não foi capaz de inibir COX-1. Entretanto a bergenina foi capaz de inibir seletivamente COX-2.

A citoproteção gástrica é conferida por algumas substâncias, como as prostaglandinas. Os AINEs desencadeiam ação inibitória sobre a ciclooxigenase inibindo a formação de prostaglandinas, tendo como efeito adverso os danos gástricos (CARVALHO, 2004). A indometacina é um potente analgésico e anti-inflamatório, porém causa grandes danos na mucosa gástrica, como confirmado nesse experimento. O tratamento com a acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg, v.o., bloqueou em 78,55% a geração de lesões gástricas por estresse quando comparada ao grupo tratado com indometacina. Além disso, a geração de lesões gástricas do tipo 1+ (leves) e 3+ (severas com bordas hemorrágicas), em animais submetidos ao



estresse foi bloqueada significativamente, em relação à indometacina, quando tratados com acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg (Tabela 13).

As COX-1, ditas como constitutivas, auxiliam na manutenção da integridade da mucosa gastroduodenal, homeostase vascular, agregação plaquetária e modulação do fluxo renal (MONTEIRO et al., 2008). A acetilbergenina mostrou efeitos menos danosos à mucosa gástrica, apresentando menor índice de lesões com diferença significativa quando comparado à indometacina. Esses resultados sugerem uma ação protetora da mucosa gástrica, como verificada com a bergenia (30 mg/kg, i.v.) quando exerceu efeito anti-ulcerogênico em ratos submetidos ao modelo de úlcera gástrica induzida por estresse (ABE; SAKAI; UCHIDA, 1980). No entanto, os autores admitiram que a concentração de bergenia (30 mg/kg) usada para promover esses efeitos tenha sido elevada, além disso, essa substância não foi efetiva nesse experimento quando administrada oralmente ou subcutaneamente mesmo em doses mais elevadas. Neste mesmo trabalho foi realizado o modelo de úlceras gástricas induzidas por histamina e verificado que o tratamento com a bergenia (300 mg/kg, i.v.) promoveu inibição de úlceras de modo significativo. Isto sugere outra possibilidade para a ação anti-ulcerogênica de acetilbergenina, através do bloqueio de receptores H<sub>2</sub> da mucosa gástrica uma vez que estes receptores quando ativados pela histamina estimulam a secreção de ácido gástrico (BECKER; DOMSCHKE; POHLE, 2004; LANZA et al., 2009).

Existem outras comprovações experimentais que reforçaram a atividade anti-ulcerogênica da bergenia como no estudo de Goel et al. (1997) que ao testarem essa substância em modelo de úlceras gástricas induzidas por aspirina, verificaram que a bergenia (25 e 50 mg/kg, v.o.) produziu efeitos anti-ulcerogênicos. Nesse estudo foi realizado outro ensaio, o de liberação de prostaglandinas por incubação da mucosa do cólon humano e foi observado que a bergenia (1-10 µg/mL) produziu efeito estimulador sobre a liberação de prostaglandinas nessa mucosa. Esses autores sugeriram que os efeitos gastroprotetores da bergenia possam ser devido ao aumento da produção de prostaglandinas, o que também pode ser válido para acetilbergenina.

Há evidências de que as prostaglandinas (E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub>) possuem efeitos antifibróticos *in vivo*. Com base nessas afirmações e nas comprovações de que a bergenia aumenta a síntese prostaglandinas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> na mucosa do cólon humano, Chung et al (2001) demonstraram que a bergenia e acetilbergenina quando

testadas em modelo de fibrose hepática induzida por obstrução biliar apresentavam efeitos anti-hepatofibróticos.

Finalmente, a análise dos resultados obtidos demonstrou que acetilbergenina possui uma potencial propriedade anti-inflamatória. No entanto, investigações ainda são necessárias a fim de estudar mais detalhadamente a relação entre estrutura e atividade de acetilbergenina, já que seus resultados foram bastante promissores.

## 7. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos nos testes de nocicepção nos levam a sugerir que:
  - a) Acetilbergenina na dose de 6,8 mg/kg não apresentou atividade antinociceptiva de natureza central;
  - b) Acetilbergenina possui atividade antinociceptiva de origem anti-inflamatória e, provavelmente, esta ação envolve receptores opióides.
- Nos modelos que avaliam atividade anti-inflamatória (edema de pata induzido por carragenina e por dextrana, induzido por óleo de cróton e peritonite em ratos induzida por carragenina) a acetilbergenina foi eficaz em todos os modelos.
- A ação anti-inflamatória de acetilbergenina parece dependente de vários mecanismos:
  - a) Ação sobre receptores histaminérgicos ( $H_1$  e  $H_2$  e/ou serotoninérgicos periféricos e;
  - b) Inibindo COX-2;
  - c) Inibindo PLA<sub>2</sub>
- Apesar da atividade anti-inflamatória de acetilbergenina ser característica de compostos não-esteroidais, esta provoca pouca interferência deletéria sobre a mucosa gástrica.

Com base nestes resultados conclui-se que acetilbergenina demonstrou significativo efeito anti-inflamatório e analgésico periférico.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K.; SAKAI, K.; UCHIDA, M. Effects of bergenin on experimental ulcers-prevention of stress induced ulcers in rats. **General Pharmacology**, v. 11, p. 361-368, 1980.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p.13-19, 1993.
- ALENCAR, M. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PINHEIRO, D. C. S. N. Inflamação e sua modulação por antiinflamatórios não esteróides: riscos e benefícios. **Ciência Animal**, v.15, n.1, p. 33-41, 2005.
- ALMEIDA, A.P.; BAYER, B. M.; HORAKOVA, Z.; BEAVEN, M. A. Influence of indomethacin and other anti-inflammatory drugs on mobilization and production of neutrophils: studies with carrageenan-induced inflammation in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 214, p. 74-79, 1980.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.
- ALVES, C. F.; ALVES, V. B. F.; DE ASSIS, I. P.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; UBER-BUCEK, E.; DAL-SECCO, D.; CUNHA, F. Q.; REHDER, V. L. G.; NAPIMOGA, M. H. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, p. 1097-1104, 2009b.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; VILLAREAL, C. F.; SOARES, M. B. Substâncias bioativas de *Cenostigma gardnerianum* Tul. (Leguminosae). In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 2009, Fortaleza, CE. **Anais eletrônicos da 32ª. Reunião Anual da SBQ**, Fortaleza, 2009a. CD-ROM
- ARAÚJO, F. L. O. De. **Estudo dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de (Ometil)-N-benzoil tiramina (riparina I) de *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) em camundongos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2007.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BARNES, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clinical Science**, v. 94, p. 557-572, 1998.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008.
- BASILE, A. C.; SERTIÉ, J. A. A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia Sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, p. 185-197, 1990.
- BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T.; SOUZA, G. H. B.; PEDRAZZI, A. H. P.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p. 279-282, 2001.
- BECKER, J. C.; DOMSCHKE, W.; POHLE, T. Current approaches to prevent NSAID-induced gastropathy – COX selectivity and beyond. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 58, n. 6, p.587-600, 2004.

BESSONG, P. O.; OBI, C. L.; ANDREOLA, M. L.; ROJAS, L. B.; POUYSEGU, L.; IGUMBOR, E.; MEYER, J. J.; QUIDEAU, S.; LITVAK, S. Evaluation of selected South African medicinal plants for inhibitory properties against human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase. **Journal Ethnopharmacology**, v. 99, p. 83-91, 2005.

BISPO, M. D.; MOURÃO, R. H. V.; FRANZOTTI, E. M.; BOMFIM, K. B. R.; ARRIGONI-BLANK, M de F.; MORENO, M. P. N.; MARCHIORO, M.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 81-86, 2001.

BLOT, W. J.; McLAUGHLIN, J. K. Over the counter non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of gastrointestinal bleeding. **Journal of Epidemiology and Biostatistics**, v. 5, n. 2, p. 137-142, 2000.

**BRAZILIAN WOODS**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/lpf/madeira/foreword.htm>>. Acesso em: 30 de jan. de 2009.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, 2000.

BRITO, S., 1993. In: ARAGÃO, T. P. **Cassi virginia® (Cassia occidentalis L.): Abordagem farmacológica e toxicológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2006.

CAILLIET, R. **Dor: mecanismo e tratamento**. Porto Alegre: Artmed, 1999.

CALIXTO, J. B. **Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca!** Ciência hoje, São Paulo, v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmed, 2004. 480 p.

CARVALHO, J. C.; FERREIRA, L. P.; SANTOS, L. S.; CORRÊA, M. J.; OLIVEIRA CAMPOS, L. M.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of flavone and some of its derivatives from *Virola michelli* Heckel. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 173-177, 1999.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos\*. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448- 464, 2004.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 3, p. 221- 241, 1998.

CAVALCANTI, I. L.; MADDALENA, M. L. Dor. Rio de Janeiro: SAERJ, 2003. In: MAI, Carla Mirelle Giotto. **Avaliação do potencial antinociceptivo de novos 3-metil-1H-1-pirazol metil ésteres 5-substituídos em camundongos**. Dissertação de mestrado (Universidade Santa Maria-RS), 2007.

CAVALCANTI, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Museu Paraense Emílio Goeldi, edições CEJUP, CNPq, Belém, 1991. 279 p.

CHEN, Y.-F.; LI, N.; JIAO, Y.-L.; WEI, P.; ZHANG, Q.-Y.; RAHMAN, K.; ZHENG, H.-C.; QIN, L.-P. Antinociceptive activity of petroleum ether fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p. 427-436, 2008a.

CHEN, Z.; LIU, Y.-M.; SONG, B.-A.; XU, G.-F.; BHADURY, P. S.; JIN, L.-H.; HU, D.-Y.; LIU, F.; XUE, W.; ZHOU, X. Studies on the chemical constituents and anticancer

activity of *Saxifrage stolonifera* ( L) Meeb. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 1337-1344, 2008b.

CHUNG, M. W.; SUNOO, S.; KIM, S-H.; KIM, H-S. Effects of *Malloti Cortex* water extract, bergerin, and acetylbergerin on liver fibrosis induced by bile duct ligation in rats. **Journal of Applied Pharmacology**, v. 9, p. 112-118, 2001.

COLLIER, H. D. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COSTA, E. A.; SANTOS, L. R.; PONTES, I. S.; MATOS, L. G.; SILVA, G. A.; LIÃO, L. M. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cheiloclinium cognatum* root barks. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 508-513, 2007.

CUATRECASAS, J. A. **A taxonomic revision of Humiriaceae**. Contributions from the United States National Herbarium. Bulletin of the United States National Museum, 35, part 2, p. 25-214, 1961.

DAVIES, P.; BAILEY, P. J.; GOLDENBERG, M. M.; FORD-HUTCHINSON, A. W. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 2, p. 335-337, 1984.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DIONNE, R. A.; KHAN, A. A.; GORDON, S. M. Analgesia and COX-2 inhibition. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 19, p. 63-70, 2001.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of the morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 167-174, 1977.

EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics. II. Dithienyl-butenyl and Dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-393, 1953.

FABIOLA, G. F.; DAMODHARAN, L.; PATTABHI, V.; NAGARAJAN, K. Cyclooxygenase-2- An attractive target for fruitful drug design. **Current Science**, v. 80, n. 1, 2001.

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

FENG, Y.; CUI, M.; WILLIS, M. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced  
FERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ, A.; GARCÍA, M. D.; SÁENZ, M. T. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. **IL Farmaco**, v. 56, p. 335-338, 2001.

FERREIRA, D. T.; FACCIÓN, M. Opiáceos, Opióides de ação analgésica e antagonistas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 125-136, 2005.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; FONTENELE, J. B.; PESSOA, O. D.L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v.11, p. 315-322, 2004.

FERREIRA, S. H.; VANE, J. R. New aspects of the mode of action of non-steroid antiinflammatory drugs. **Annual Review of Pharmacology**, v. 14, p. 57-73, 1974.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-71, 2000.

GENTRY, A. H. **Woody plants of northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru) with supplementary notes on herbaceous taxa**. Published in Association with Conservation International, p. 466, 1993.

GERALDO, J. M.; ALFENA, R. C. G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n.6, São Paulo, 2008.

GOEL, R. K.; MAITI, R.N.; MANICKAM, M.; RAY, A. B. Antiulcer activity of naturally occurring pyrano-coumarin and isocoumarins and their effect on prostanoid synthesis using human colonic mucosa. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, p. 1080-1083, 1997.

HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A<sub>4</sub> Hydrolase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161. P. S25–S31, 2000.

HAWORTH, O.; BUCKLEY, C. D. Resolving the problem of persistence in the switch from acute to chronic inflammation. **PNAS**, v. 104, n. 52, 20647–20648, 2007.

HAY, J.E.; HAYNES, L. J. Bergenin, a C-glucopyranosyl derivative of 4-O-methylgallic acid. **Journal of Chemical Society**, p. 2231-2238, 1958.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANNA, H. M.; MULLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**, v. 374, p.1-20, 2003.

HERZNER, H.; PALMACCI, E.R.; SEEBERGER, P. H. Short total synthesis of 8,10-Di-O-methylbergenin. **Organic Letters**, v. 4, n. 17, p. 2965-2967, 2002.

HUBINGER, S. Z.; POLITI, F. A.S.; SALGADO, H. R.N.; PIETRO, R. C.L. R.; MOREIRA, R. R.D. Evaluation of the activity on intestinal motility of *Endopleura uchi* (Humiriaceae) aqueous extract. In: BRAZILIAN CONFERENCE ON NATURAL PRODUCTS, 13, 2007, São Paulo. **Anais**. São Paulo: BCNp, 2007.

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

IMBELONI, L. E. Naloxona: Estado Atual. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 39, n. 2, 1989.

JAHROMI, M. A.F.; CHANSOURIA, J. P. N.; RAY, A. B. Hypolipidaemic activity in rats of bergenin, the major constituent of *Flueggea microcarpa*. **Phytotherapy Research**, v.6, p. 180-183, 1992.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. New York: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

KIDD, B. L.; URBAN, I. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KIM, H.-S.; LIM, H.-K.; CHUNG, M.-W.; KIM, Y.-C. Antihepatotoxic activity of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated hepatocytes. **Journal Ethnopharmacology**, v. 69, p. 79-83, 2000.

KIMURA, Y.; SUMIYOSHI, M.; SAKANAKA, M. Effects of *Astilbe thunbergii* rhizomes on wound healing: Part 1. Isolation of promotional effectors from *Astilbe thunbergii* rhizomes on burn wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 72-77, 2007.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Antiinflamatórios não esteroidais**. Química Farmacêutica, 1988.p.181–201.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **FedProc**, v.18, p.412, 1959.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Pró-inflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.

LANZA, F. L.; CHAN, F. K. L.; QUIGLEY, E. M. M. Guidelines for Prevention of NSAID- Related Ulcer Complications. **American Journal of Gastroenterology**, v. 104, p. 728-738, 2009.

LEWIS, A. J.; NELSON, D. J.; SEGRUE, M. F. On the ability of prostaglandin E<sub>1</sub> and arachidonic acid to modulate experimentally induced oedema in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v.55, p. 51-56, 1975.

LI, YF.; HU, LH.; LOU, FC.; LI, J.; SHEN, Q. PTP1B inhibitors from *Ardisia japonica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 7, p. 13-8, 2005.

LIM, H.-K.; KIM, H.-S.; CHOI, H.-S.; OH, S.; CHOI, J. Hepatoprotective effects of bergenin, a major constituent of *Mallotus japonicus*, on carbon tetrachloride-intoxicated rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 72, p. 469-474, 2000a.

LIM, H.-K.; KIM, H.-S.; CHOI, H.-S.; OH, S.; JANG, C.-G.; CHOI, J.; KIM, S.-H.; CHANG, M. J. Effects of acetylbergenin against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 5, p.471-474, 2000b.

LIM, H.-K.; KIM, H.-S.; CHUNG, M.-W.; KIM, Y.-C. Protective effects of bergenin, the major constituent of *Mallotus japonicus*, on D-galactosamine-intoxicated rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 69-72, 2000c.

LUNA, J. S.; SILVA, T. M.; BENTO, E. S.; SANT'ANA, A. E. G. Isolamento e Identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23, 2000, Poços de Caldas-MG: **Livro de Resumos**, v.2, 2000

MADUKA, H. C. C.; OKOYE, Z. S. C. Bergenin, A Nigerian alcoholic beverage additive from *Sacoglottis gabonensis* as an antioxidant protector of mammalian cells against 2,4-dinitrophenyl hydrazine-induced lipid peroxidation. **Journal of Toxicology**, v. 3, n. 1, 2006.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. da P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 447-450, 2007.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. **Studies of edible Amazonian plants**. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits, p. 8, 2002.

MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MANNING, P. T.; HAUSER, S. D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W. G.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 91, p. 3228-3232, 1994.

McADAM, B. F.; CATELLA-LAWSON, F.; MARDINI, I. A.; KAPOOR, S.; LAWSON, J. A.; FITZGERALD, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 96, p. 272-277.

MEKONNEN, T.; URGA, K.; ENGIDAWORK, E. Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* Jacq in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 2009 (*Disponível online*).

MERCADANTE, S. Problems of long-term spinal opioid treatment in advanced cancer patients. **Pain**, v. 79, p. 1-13, 1999.



- METCALFE, D. D.; BARAM, D.; MEKORI, Y. A. Mast cells. **Physiological reviews**, v. 77, n. 4, p. 1033-1064, 1997.
- MILANO, J. **Avaliação do potencial antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1H-pirazol metil ésteres inéditos em camundongos**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica e Toxicologia), Santa Maria, RS, 2008.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, n.1, p.1-164, 1999.
- MIÑO, J.; MOSCATELLI, V.; HNATYSZYN, O.; GORZALCZANY, S.; ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Artemisia copa* extracts. **Pharmacological Research**, v. 50, p. 59–63, 2004.
- MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 9, n. 2, 2008.
- MOREIRA, R. R. D.; PELISSARI, G. P.; ANANIAS, S.A.; POLITI, F. A.S. ; CARLOS, I. Z.; PIETRO, R. C.L R.; SANTOS, L. E.; PLACERES, M. C. P. Avaliação da atividade imunológica in vitro do extrato aquoso de *Endopleura uchi* Huber (Humiriaceae)-“uchi amarelo”. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, p. 82, 2007.
- NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 853–859, 1999.
- NAZIR, N.; KOUL, S.; QURISHI, M. A.; TANEJA, S. C.; AHMAD, S. F.; BANI, S.; QAZI, G. N. Immunomodulatory effect of bergenin and norbergenin against adjuvant-induced arthritis. A flow cytometric study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 401-405, 2007.
- NEEDLEMAN, P.; TURK, J.; JAKSCHIK, B. A.; MORRISON, A. R.; LEFKOWITH, J. B. Arachidonic acid metabolism! **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 69-102, 1986.
- NETO, A. G., COSTA, J. M.L. C., BELATI, C.C., VINHOLIS, A. H.C, POSSEBOM, L. S., SILVA FILHO, A. A., CUNHA, W.R., CARVALHO, J.C.T., BASTOS, J.K., Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87–91, 2005.
- NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; DA SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1060-1064, 2009.
- NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergenin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, p. 492-494, 2004.
- OKADA, T.; SUZUKI, T.; HASOBE, S.; KISARA, K. Bergenin 1. antiulcerogenic activities of bergenin. *Nippon Yakurigaku Zasshi-Folia Pharmacologica Japonica*, v. 69, p. 369-378, 1973.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced nociception activates a monoaminergic descending inhibitory system. **Brain**, v. 814, p. 194-198, 1998.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. **Neurociência do uso e da dependência de substâncias psicoativas**. [tradução Fábio Corregiari], São Paulo: Roca, 2007.
- PARRAT, J. R.; WEST, G. B. Inhibition by various substances of oedema formation in the hind-paw of the rat induced by 5-hydroxytryptamine, histamine, dextran, eggwhite and compound 48/80. **British Journal of Pharmacology**, v. 13, p. 65–70, 1958.

- PEREIRA, M. A. da. S. **Estudo da atividade antinociceptiva da adenosina em camundongos-Análise do mecanismo de ação**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade do Vale do Itajaí, 2005.
- PIACENTE, S.; PIZZA, C.; DE. T. N.; MAHMOOD, N. Constituents of *Ardisia japonica* and their in vitro anti-HIV activity. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 65-9, 1996.
- PIEGEN, X. Traditional experience of chinese herb medicine and its application in drug research, new drug searching. In: BEAL, J.L. REINHARD, E., editors. **Natural products as medicinal agents**. Hippokrates Verlag: Stuttgart, Germany, p. 351-394, 1981.
- PINHEIRO, J. P.; ROSARIO, J. S. **Avaliação Fitoquímica e Antinociceptiva do extrato bruto aquoso liofilizado da espécie vegetal *Endopleura uchi* (Uxi amarelo)**. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de farmácia) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.
- POLITI, F. A. S. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiriaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2009.
- POLITI, F. A. S.; HUBINGER, S. Z.; LONGO, M. C.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Evaluation of the anti-inflammatory activity of *Endopleura uchi* (Humiriaceae) aqueous extract. In: Brazilian Conference on Natural Products, 37, 2007, São Paulo. **Anais**. São Paulo: BCNp, 2007a.
- POLITI, F. A. S.; MOREIRA, R. R. D.; SOUZA, T. M.; PIETRO, R. C. L. R. Preliminary studies of antimicrobial activity of *Endopleura uchi*. In: Brazilian Conference on Natural Products, 38, 2007, São Paulo. **Anais**. São Paulo: BCNp, 2007b.
- PORTAL da Secretaria da Agricultura Familiar. **Oficina nacional discute a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Disponível em: < <http://www.mda.gov.br/saf/index.php?ctuid=10878&scid=283>>.
- POSTERNAK, T.; DÜRR, K. Sur la constitution de a bergénine. **Helvetica Chimica Acta**.v. XLI, fas.IV, n. 126, p. 1159-1162, 1958.
- PRANCE, G.; SILVA, M. **Árvores de Manaus**. 17<sup>a</sup>ed. Manaus. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), p. 115-118, 1975.
- PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; McINTYRE, T. M. Platelet-activating factor and related lipid mediators. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 419-445, 2000.
- PRITHIVIRAJ, B.; SINGH, U. P.; MANICKAM, M.; SRIVASTAVA, J. S.; RAY, A. B. Antifungal activity of bergenin, a constituent of *Flueggea microcarpa*. **Plant Pathology**, v. 46, p. 224-228, 1997.
- PU, H. L.; HUANG, X.; ZHAO, J. H.; HONG, A. Bergenin is the antiarrhythmic principle of *Flueggea virosa*. **Planta Medica**, v. 68, p. 372-4, 2002.
- QIN, X.; ZHOU, D.; ZHANG, Z.-R.; HUANG, Y. Determination of bergenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography. **Pharmazie**, v. 62, p. 323-326, 2007.
- RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M. M.; GILROY, D. W. COX-2 in Inflammation and Resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

RAMAIAH, P. A.; ROW, L. R.; REDDY, D. S.; ANJANEYULU, S. R.; WAR, R.S.; PEITER, A. Isolation and characterization of berberin derivatives from *Macaranga peltata*. **Journal of Chemical Society**, v. 1, p. 2313-2316, 1979.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **RANG & DALE - Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 202 – 265.

RASTOGI, S.; RAWATA, A. K. S. A comprehensive review on berberin- a potential hepatoprotective and antioxidative phytoconstituent. **Herba polonica**, v. 54, n. 2, p. 76-79, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

REANMONGKOL, W.; NOPPAPAN, T.; SUBHADHIRASAKUL, S. Antinociceptive, antipyretic, and anti-inflammatory activities of *Putranjiva roxburghii* Wall. leaf extract in experimental animals. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, p. 290–296, 2009.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000.

RIPAMONTI, C.; BANDIERI, E. Pain therapy. **Oncology Hematology**, p. 1-15, 2009.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L. L.; CARVALHO, L. R. de.; BARROS, G. A. M. de.; GARCIA, J. B. dos S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central\*. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROOME, T.; DAR, A.; NAQVI, S.; ALI, S.; CHOUDHARY, M. I. *Aegiceras corniculatum* extract suppresses initial and late phases of inflammation in rat paw and attenuates the production of eicosanoids in rat neutrophils and human platelets. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 248–254, 2008.

ROSLAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

RUANGSANG, P.; TEWTRAKUL, S.; REANMONGKOL, W. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory activities of *Curcuma mangga* Val and Zizip rhizomes. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 1, p. 36-41, 2010.

RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, V. H. S. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 295-300, 2008.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute Inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 86, n. 1, p. 185-274, 1977.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis- revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 45, n.1, p. 86-92, 1999.

SCHULTES, R. E. De plantis Toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 1, p. 89-94, 1979.

SEGURA, L.; VILA, R.; GUPTA, M. P.; ESPOSITO-AVELLA, M.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antiinflammatory activity of *Anthurium cerrocampaense* Croat in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 243–248, 1998.

SERPELL, M. G.; MAKIN, A.; HARVEY, A. Acute pain physiology and pharmacological targets: The present and future. **Acute pain**, v. 1, n. 3, p. 31-47, 1998.

SHANLEY, P.; GAIA, G. A “fruta do pobre” se torna lucrativa: a *Endopleura uchi* Cuatrec. em áreas manejadas próximo a Belém, Brasil, 1998, cap.11, p. 219-

240. In: Alexiades, M.N. y Shanley, P. (eds.) 2004 Productos forestales, medios de subsistencia y conservación: Estudios de caso sobre sistemas de manejo de productos forestales no maderables. Volumen 3 - América Latina. Centro para la Investigación Forestal Internacional (CIFOR), Bogor, Indonesia, 499 p.

SHANLEY, P.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Editora Supercoros. CIFOR /IMAZON, Belém, 2004.

SILVA, J. L.; SILVA, R.O.; JORGE, R. M.; SILVA, G. D. F.; FILHO, S.A.V.; FONSECA, A. P.N.D.; TAGLIATI, C. A. Avaliação da atividade antiulcerogênica da *Maytenus truncata* Reiss (Celastraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 1, p. 30-35, 2005.

SILVA, S. L. da; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergerin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta amazônica**, v. 39, n. 1, p. 177-182, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184-187, 2004.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by anti-macrophage serum of the migration of PMN neutrophils into inflamed peritoneal cavity. **Agents and Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

SOUZA, G. H. B.; SILVA FILHO, A. A. da, SOUZA, V. A. de, PEREIRA, A. C.; ROYO, V. de A.; SILVA, M. L. A.; SILCA, R.; DONATE, P. M.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-*O*-acetyl, (-)-*O*-methyl, (-)-*O*-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **IL FARMACO**, v. 59, p. 55-61, 2004.

SRINIVASAN, R.; CHANDRASEKAR, MJN.; NANJAN, MJ.; SURESH, B. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. **Journal Ethnopharmacology**, v. 113, p. 284-291, 2007.

SULAIMAN, M. R.; HUSSAIN, M. K.; ZAKARIA, Z. A.; SOMCHIT, M. N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 557-561, 2008.

SWARNALAKSHMI, T.; SETHURAMAN, M. G.; SULOCHANA, N.; ARIVUDAINAMBI, R. A note on the antiinflammatory activity of bergerin. **Current Science**, v. 53, n. 17, p. 917, 1984.

TAKAHASHI, H.; KOSAKA, M.; WATANABE, Y.; NAKADE, K.; FUKUYAMA, Y. Synthesis and neuroprotective activity of bergerin derivatives with antioxidant activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1781-8, 2003.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, p. 1-6, 2009 (*Disponível online*).

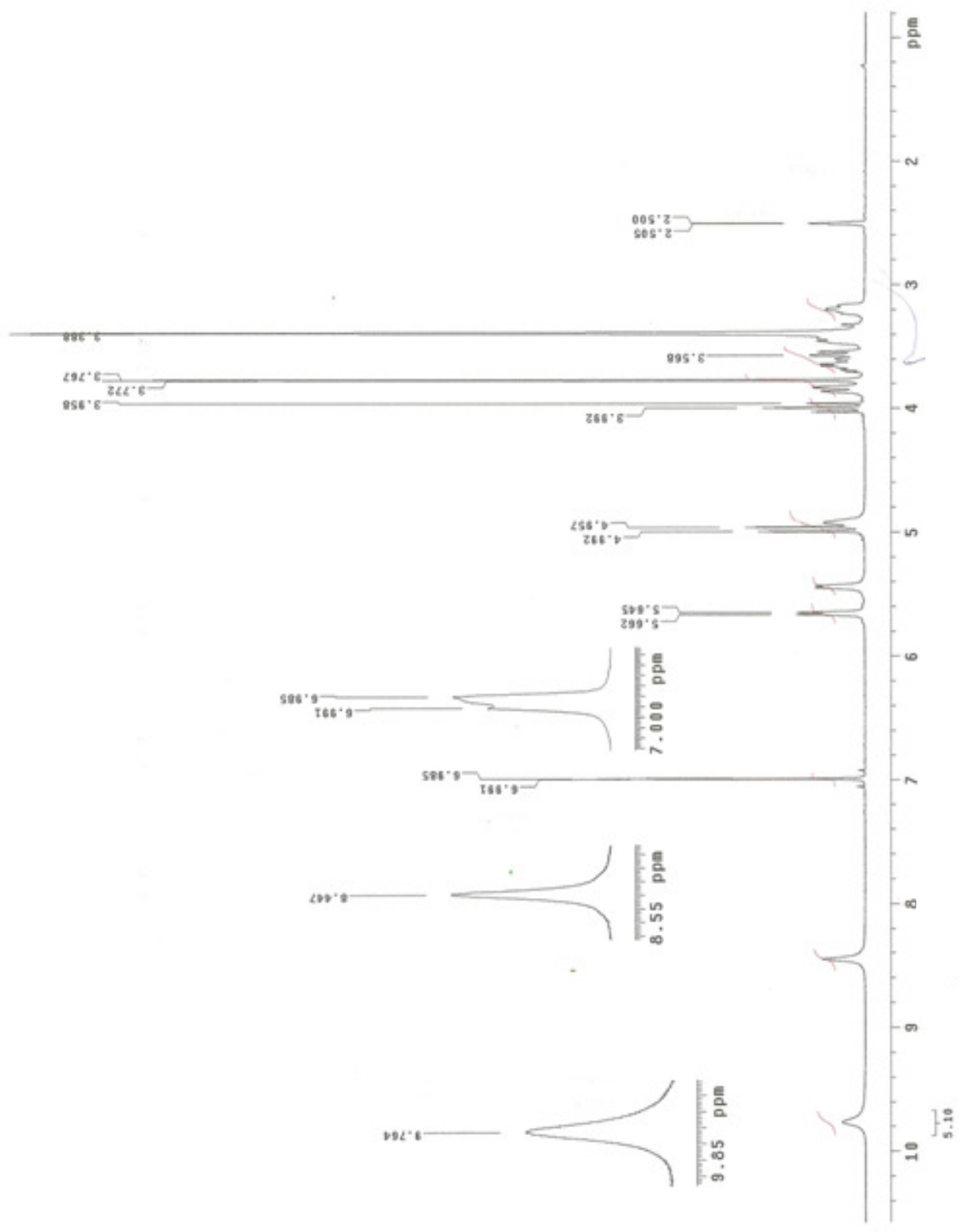
TJØLSEN, A.; BERGE, O-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation on the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. **Animais models of analgesia**. In: The pharmacology of pain (ed. Dickenson, a. e Besson, j.m.), p. 1-20, Berlin: Springer, 1997.

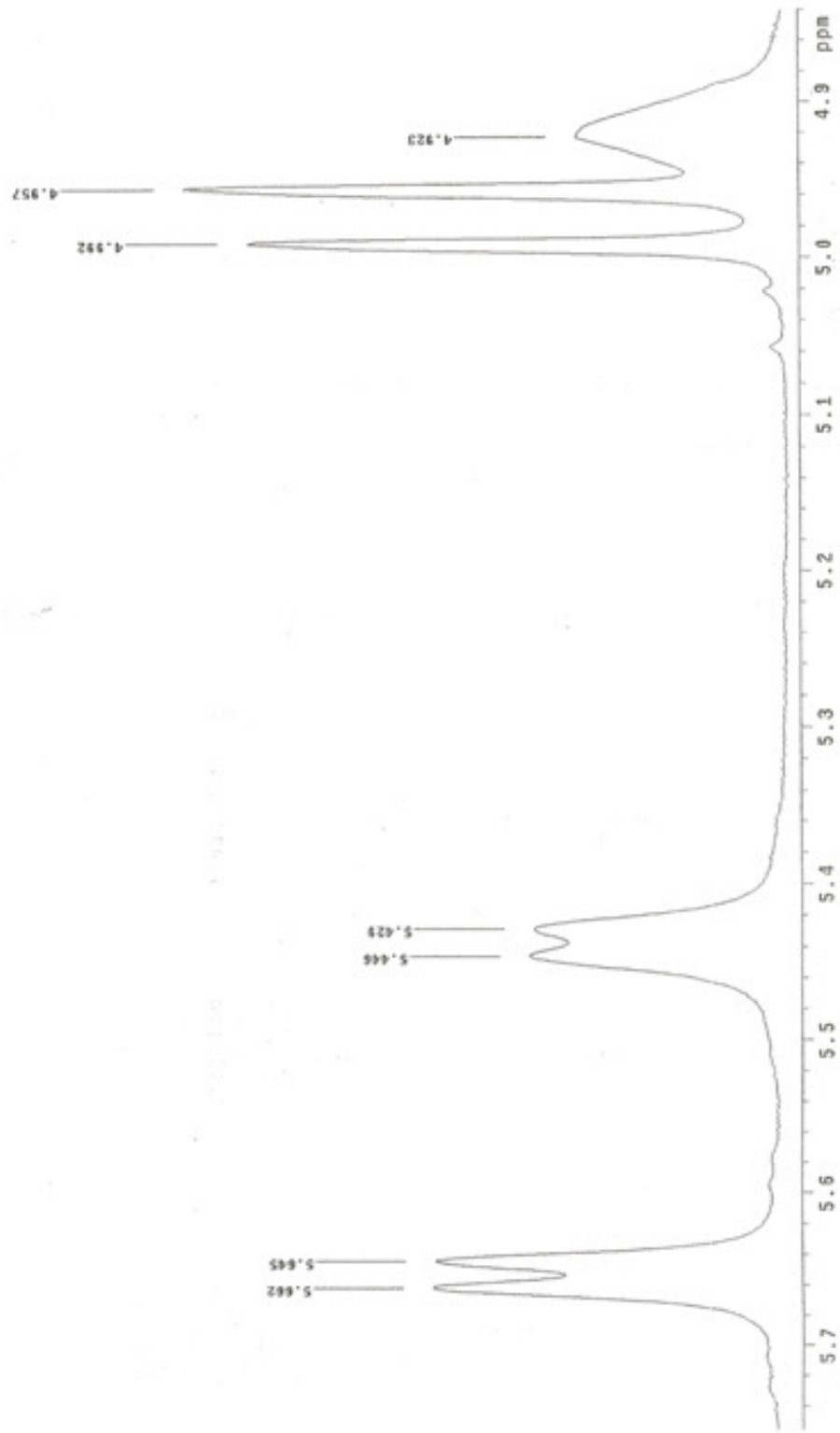
TOBACMAN, J. K. Review of Harmful Gastrointestinal Effects of Carrageenan in Animal Experiments. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 10, p. 983-994, 2001.

- TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. The croton oil Ear test revisited. **Agents Actions**, v. 17, p. 347-349, 1985.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97–120, 1998.
- VANE, J. R.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **FASEB Journal**, v. 1, p. 89-96, 1987.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. da. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 308-313, 2008.
- VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298–301, 2005.
- VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1969.
- VINEGAR, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Proceeding of the Society Experimental Biological**, v. 143, n. 3, p.711-714, 1973.
- VITOR, A. O.; PONTE, E. L.; SOARES, P. M.; RODRIGUES, M. E. de S.; LIMA, R. C. de S.; CARVALHO, K. de M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; VASCONCELOS, S. M. M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v.2, n.1, p.87-96, 2008.
- WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547–1565, 2008.
- WANG, M.-W.; HAO, X.; CHEN, K. Biological screening of natural products and drug innovation in China. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 362, p. 1093–1105, 2007.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, PART 2, 1999.
- WHITTLE, B. A. Release of kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v.3, p. 369-378, 1964.
- WHO, World Health Organization. **Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants**. Genebra, v.1, p. 133, 2003.
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G.W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**, v.111, p.544-547, 1962.
- WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300, 1944.
- YE, Y-P.; SUN, H.-X.; PAN, Y.-J. Bergenin monohydrate from the rhizomae of *Astible chinensis*. **Acta Crystallographica**, v. 60, p. 0397-0398, 2004.
- ZAMARRUD; AHMAD, V. U.; ANJUM, S.; MOHAMMAD, F. W.; QAISER, M. Desmethylbergenin hemihydrates. **Acta Crystallographica**, p. 4626-4628, 2006.

## **APÉNDICE A- Espectros**

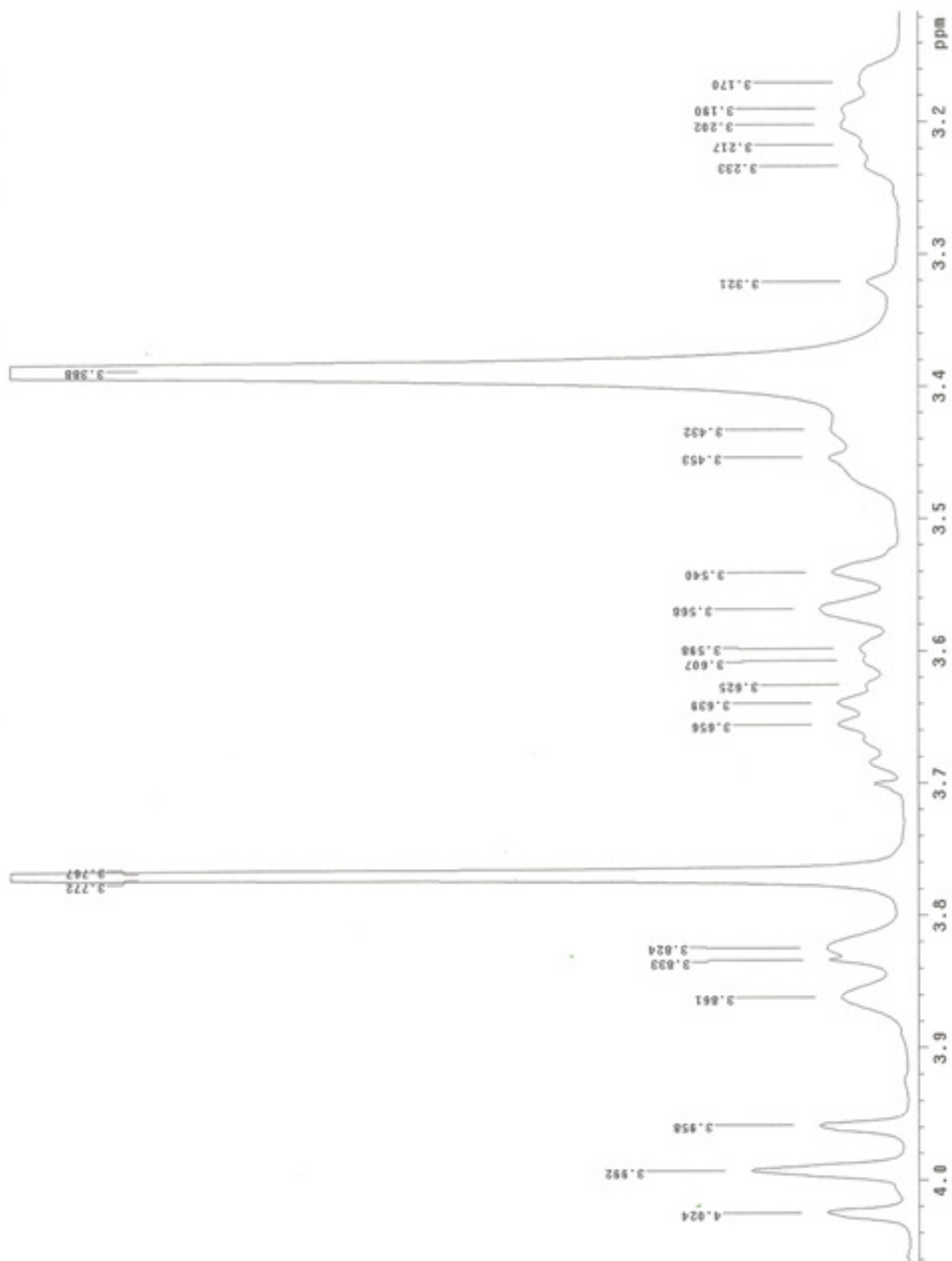


**Figura 18-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de  $\text{S}_1$



**Figura 19-** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) de  $\text{S}_1$





**Figura 20-** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ) de S<sub>1</sub>

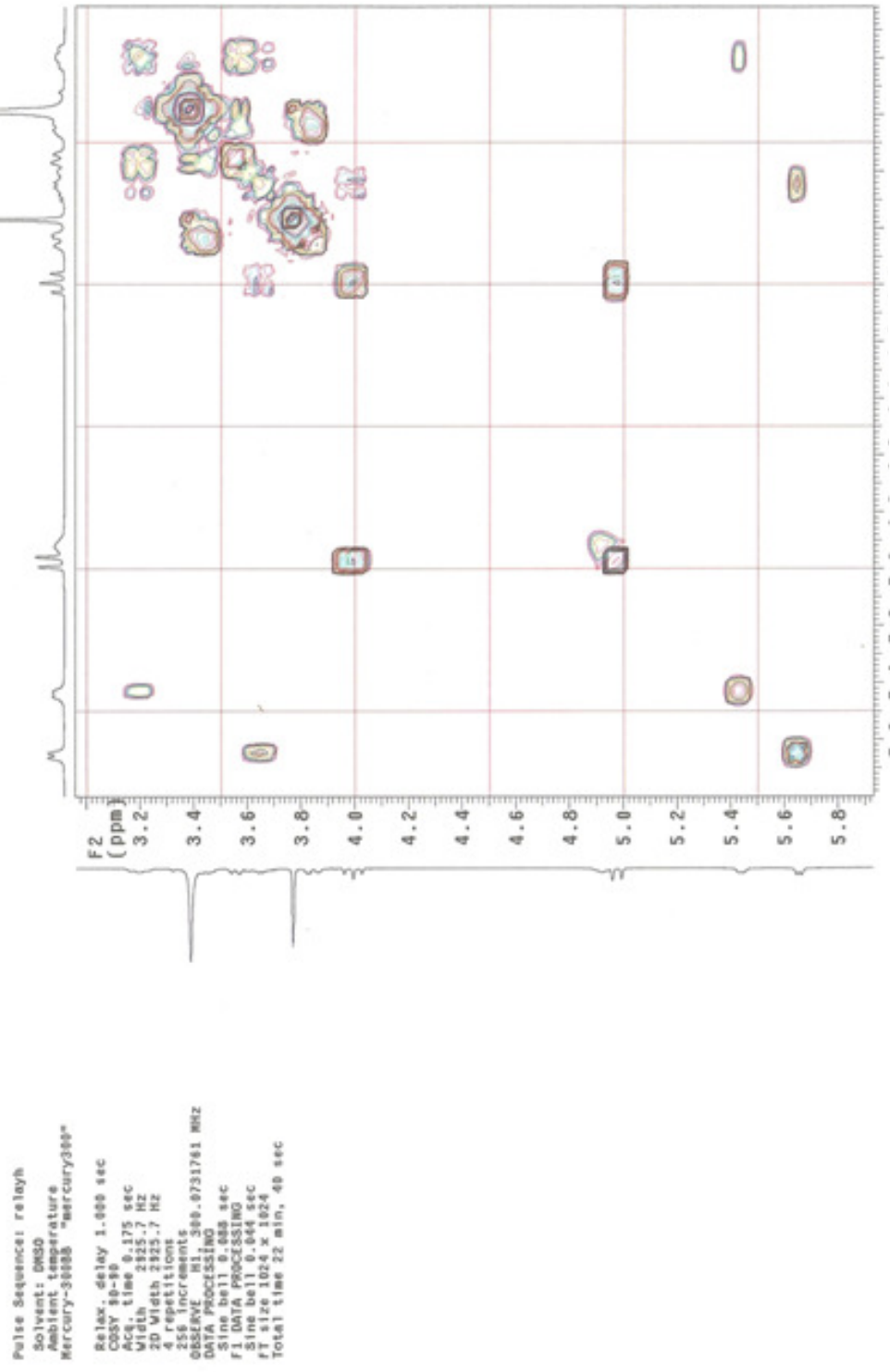


Figura 21- Expansão do Espectro de COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO) de  $S_1$

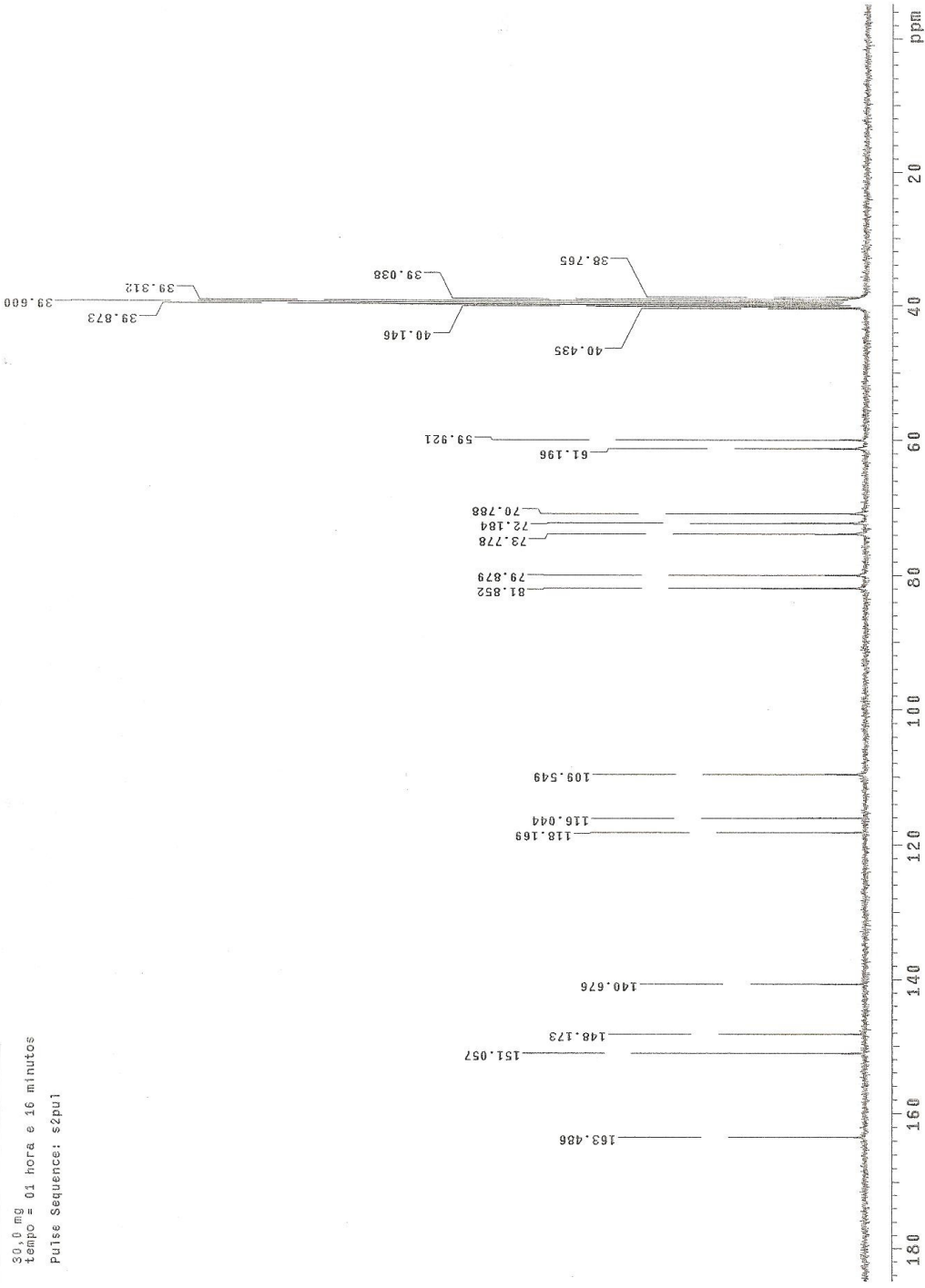
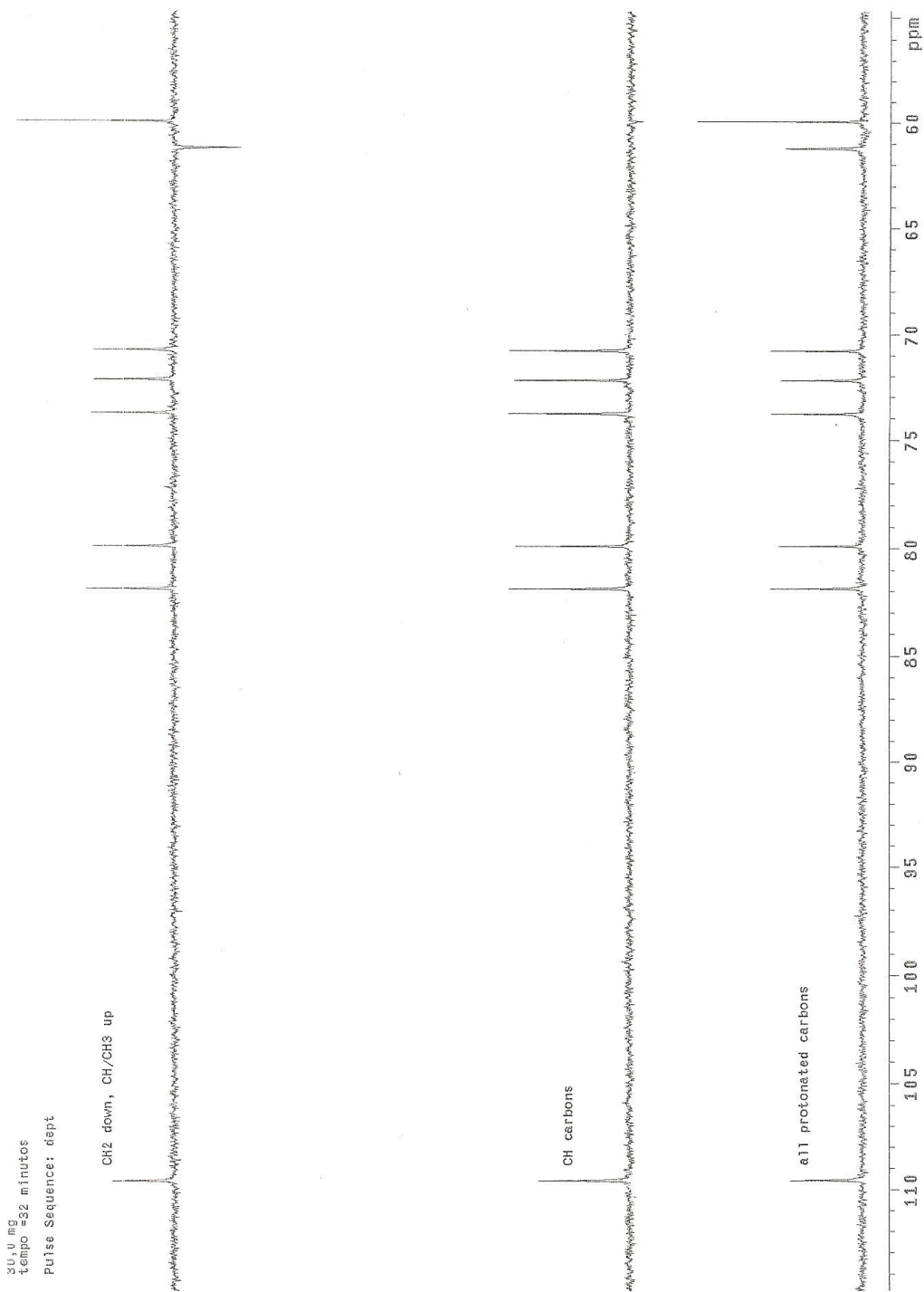
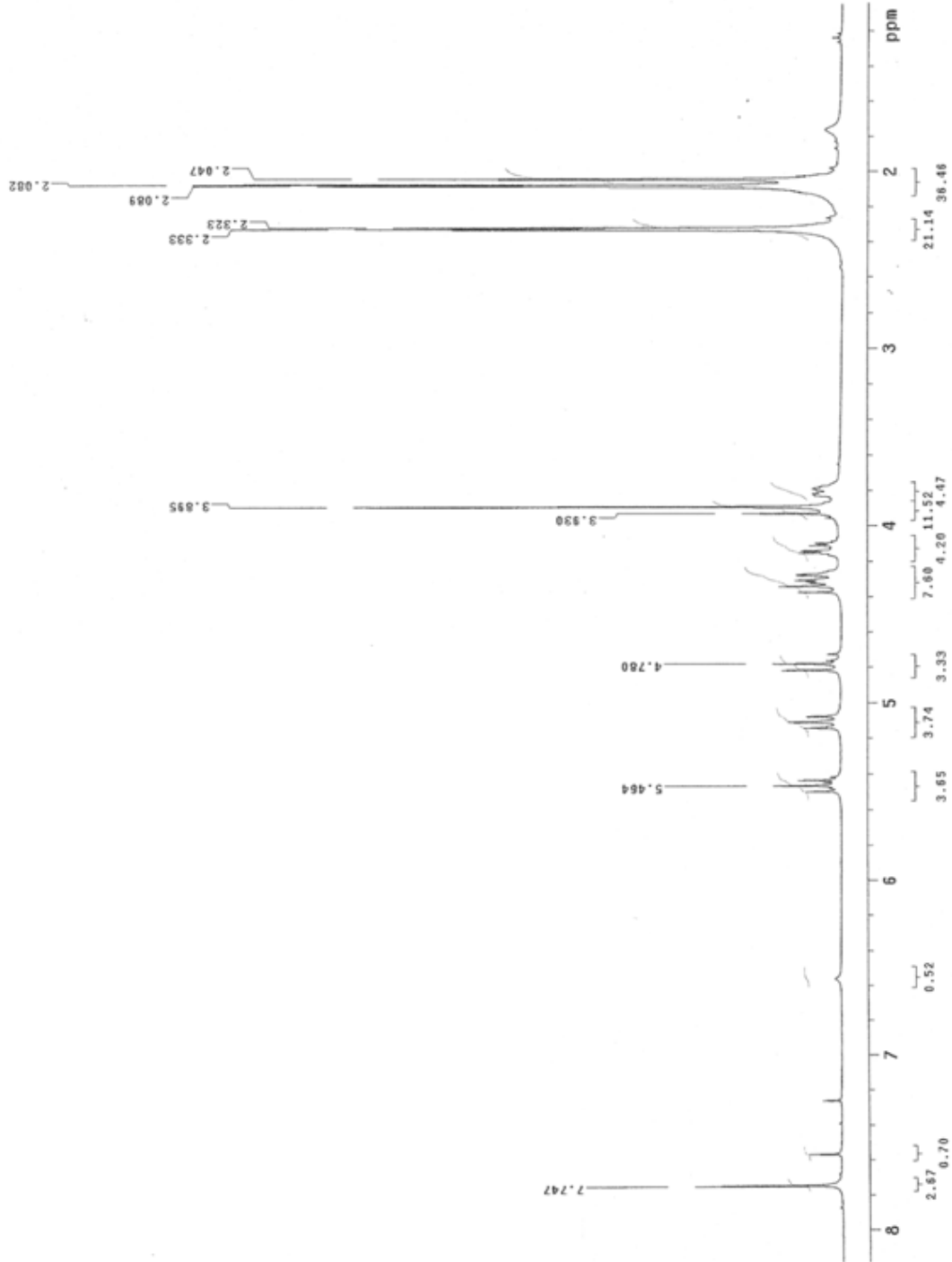


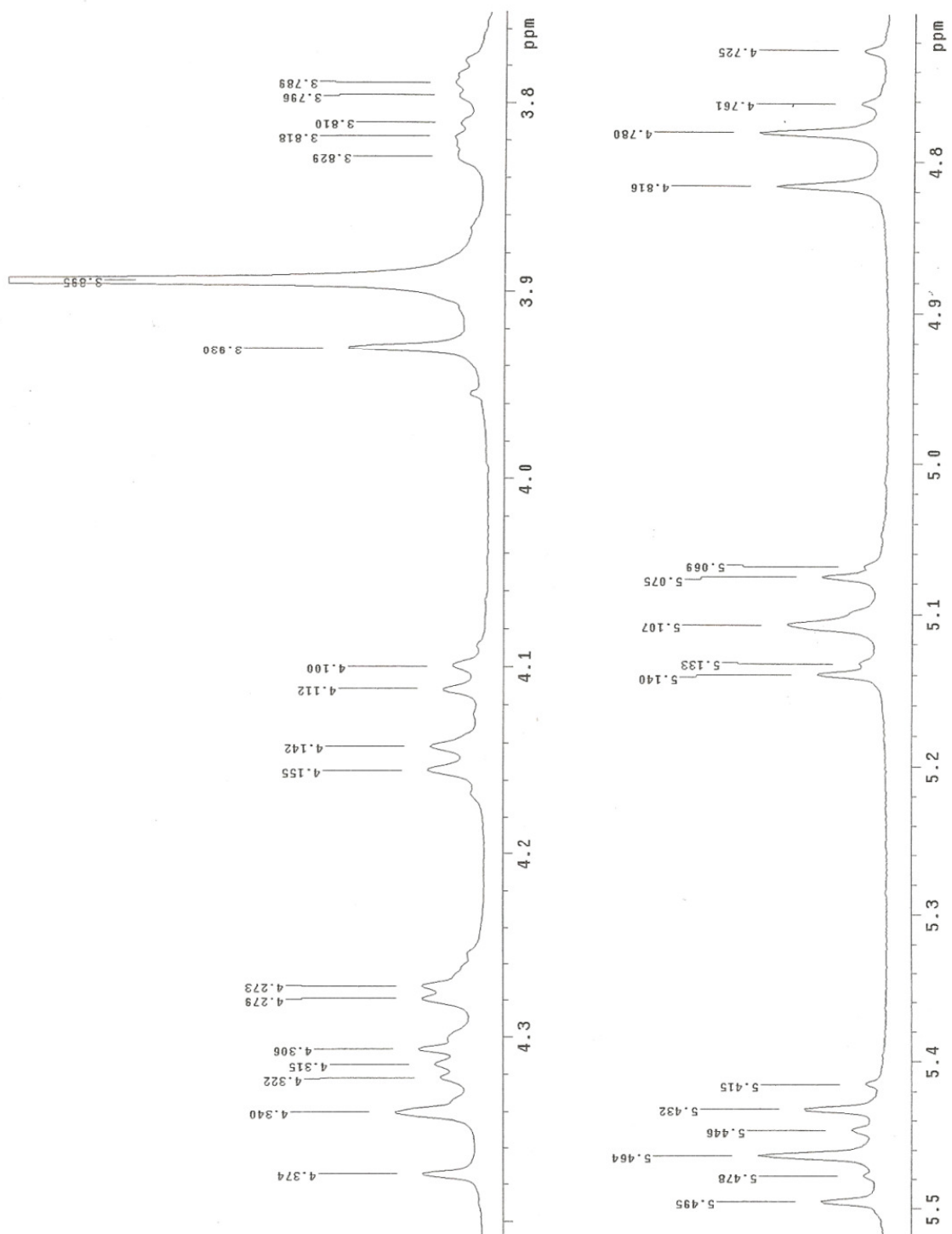
Figura 22- Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) de S<sub>1</sub>



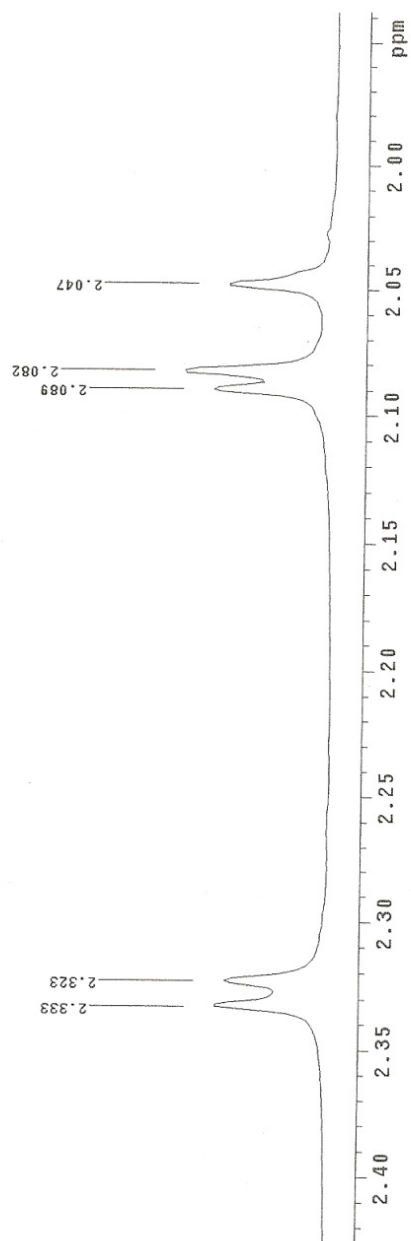
**Figura 23-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT (75 MHz, DMSO) de S1)



**Figura 24-** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de  $\text{S}_5$



**Figura 25-** Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de S5



**Figura 26** - Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de  $\text{S}_5$

lab ren ufpa  
Jaqueline-tourivaldo  
amoist. s/codigo (cdcl3)  
ren82ge2d  
operador marcal  
07.10.08

35.0 mg

Pulse Sequence: relayh

Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
Mercury-3000 "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec  
COSY 10-10  
Acq. time 6.227 sec  
Width 2251.7 Hz  
2D Width 2251.7 Hz  
4 repetitions  
256 increments  
0.25 sec/increment  
DATA PROCESSING  
Sine bell 0.114 sec  
F1 DATA PROCESSING  
Sine bell 0.657 sec  
FT size 1024 x 1024  
Total time 23 min, 47 sec

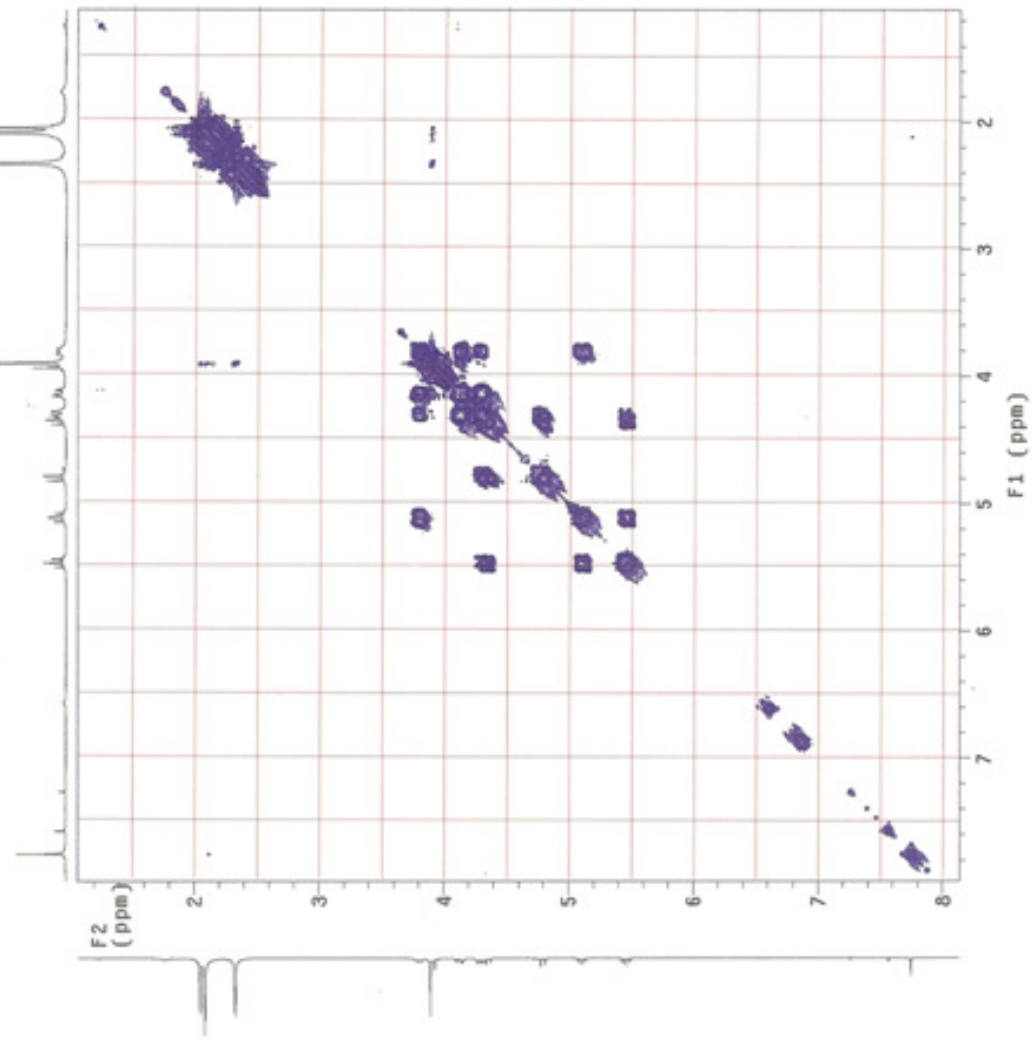
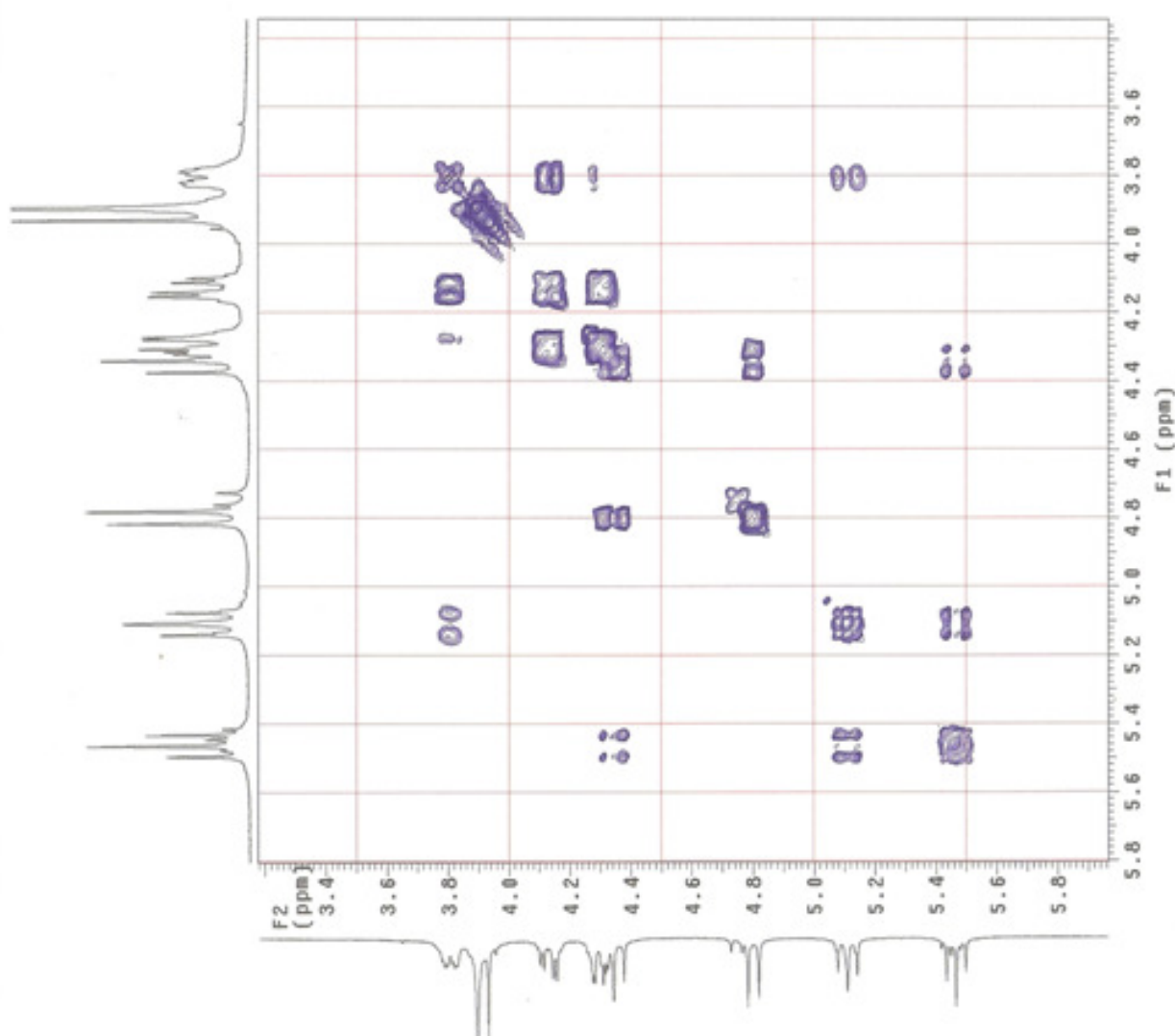


Figura 27- Espectro de COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de S5





```

lab ren ufpa
Jaqueline-tourivaldo
amoist. s/codigo (cdc13)
ren682gac
operador marcal
07.10.08

35.0 mg

Pulse Sequence: relayh
Solvent: CDCl3
Ambient temperature
Mercury-3000B "mercury300"

Relax. delay 1.000 sec
COSY 90-90
Acq. time 0.227 sec
Width 2251.7 Hz
2D Width 2251.7 Hz
4 repetitions
256 increments
OBSERVE F1, 300.0717543 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.114 sec
Sine bell 0.057 sec
FT size 1024 x 1024
Total time 23 min, 47 sec

```

Figura 28- Expansão do espectro de COSY  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de  $\text{S}_5$

lab\_rmn\_uflpa  
jaqueline-tourivaldo  
amost\_s.codigo (cdc13)  
rmn\_862c08  
operador\_marca1  
07.10.08  
35.0 mg  
tempo = 01 hora  
Pulse Sequence: s2pu1

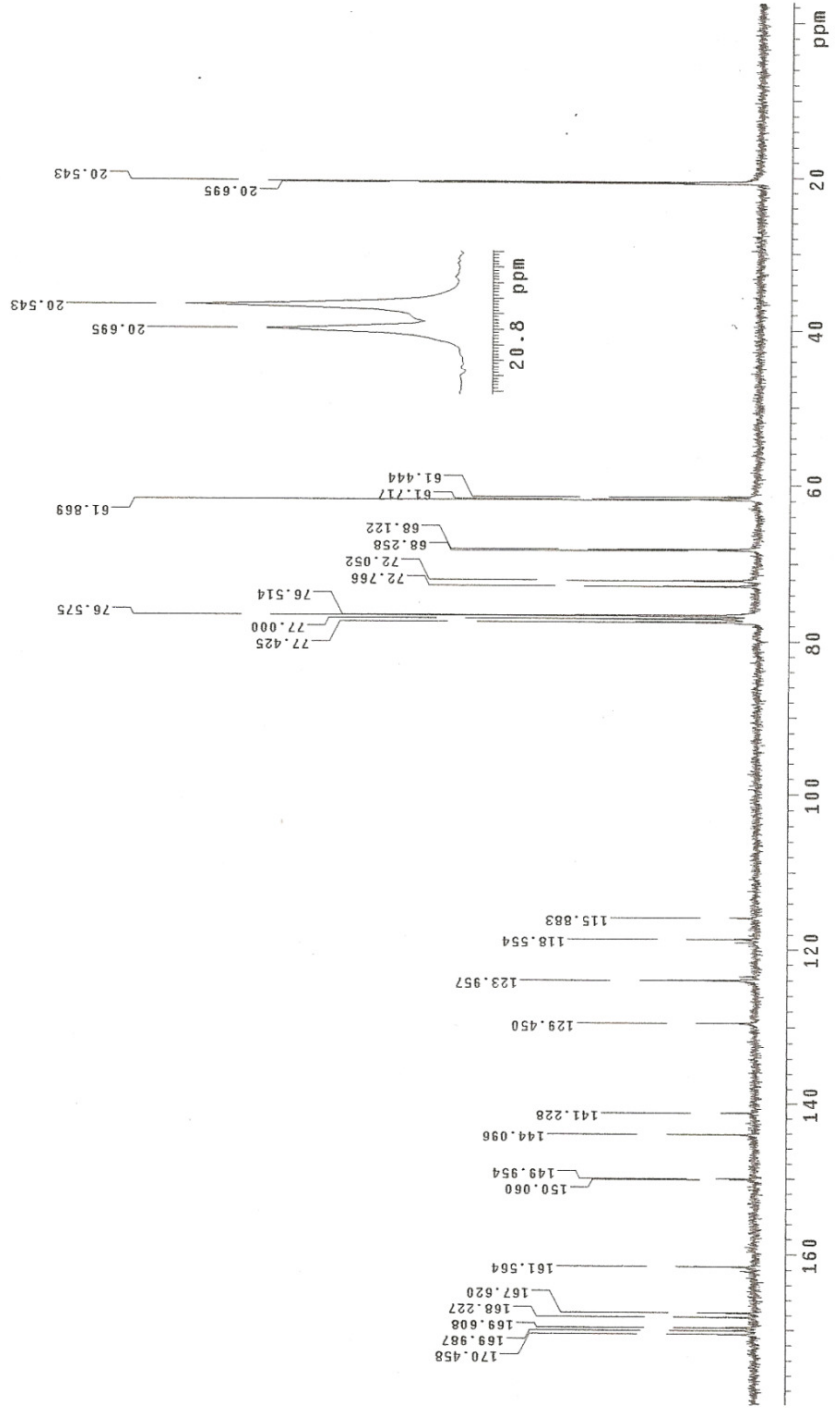
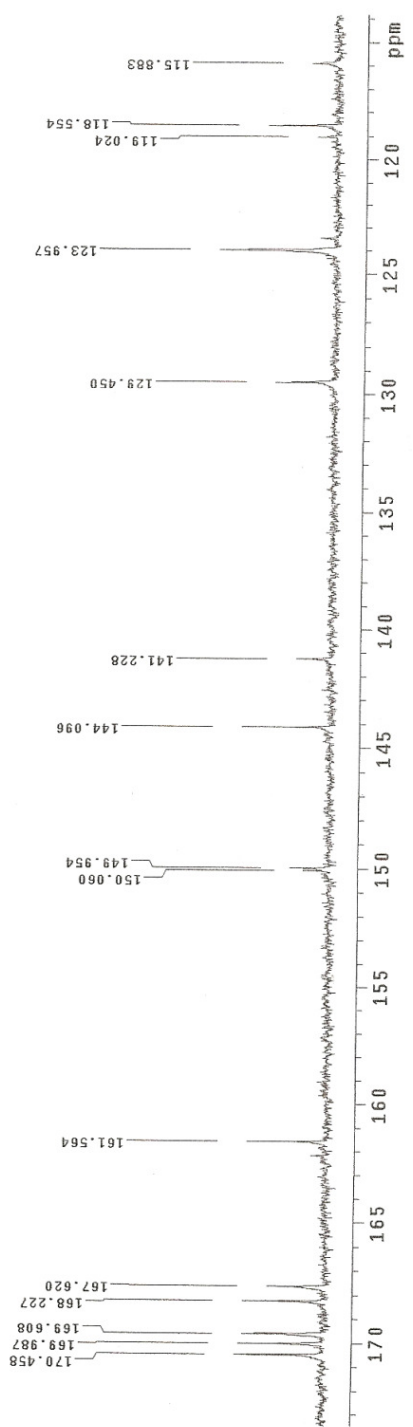
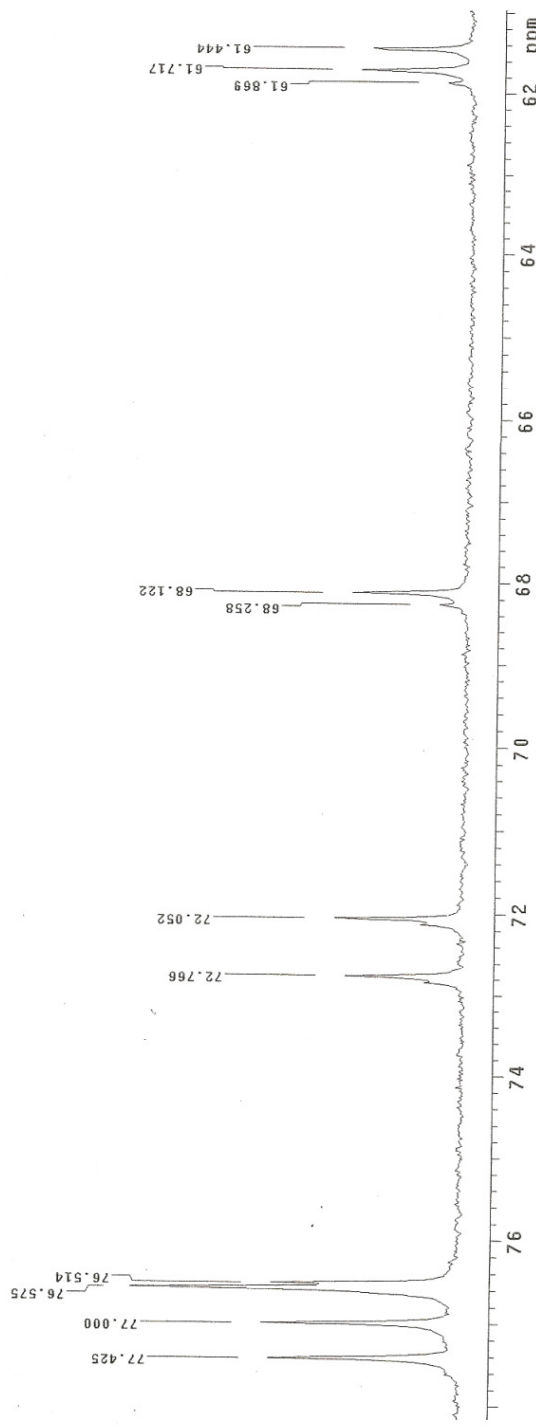


Figura 29- Espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de S<sub>5</sub>



**Figura 30-** Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de S<sub>5</sub>

lab ran sfaa  
jasuelino-fourivaldo  
amoist. s/codigo (cdcl3)  
ran 552dpt18  
operador marca1  
07.10.08  
35.0 mg

Pulse Sequence: dept

CH2 down, CH/CH3 up

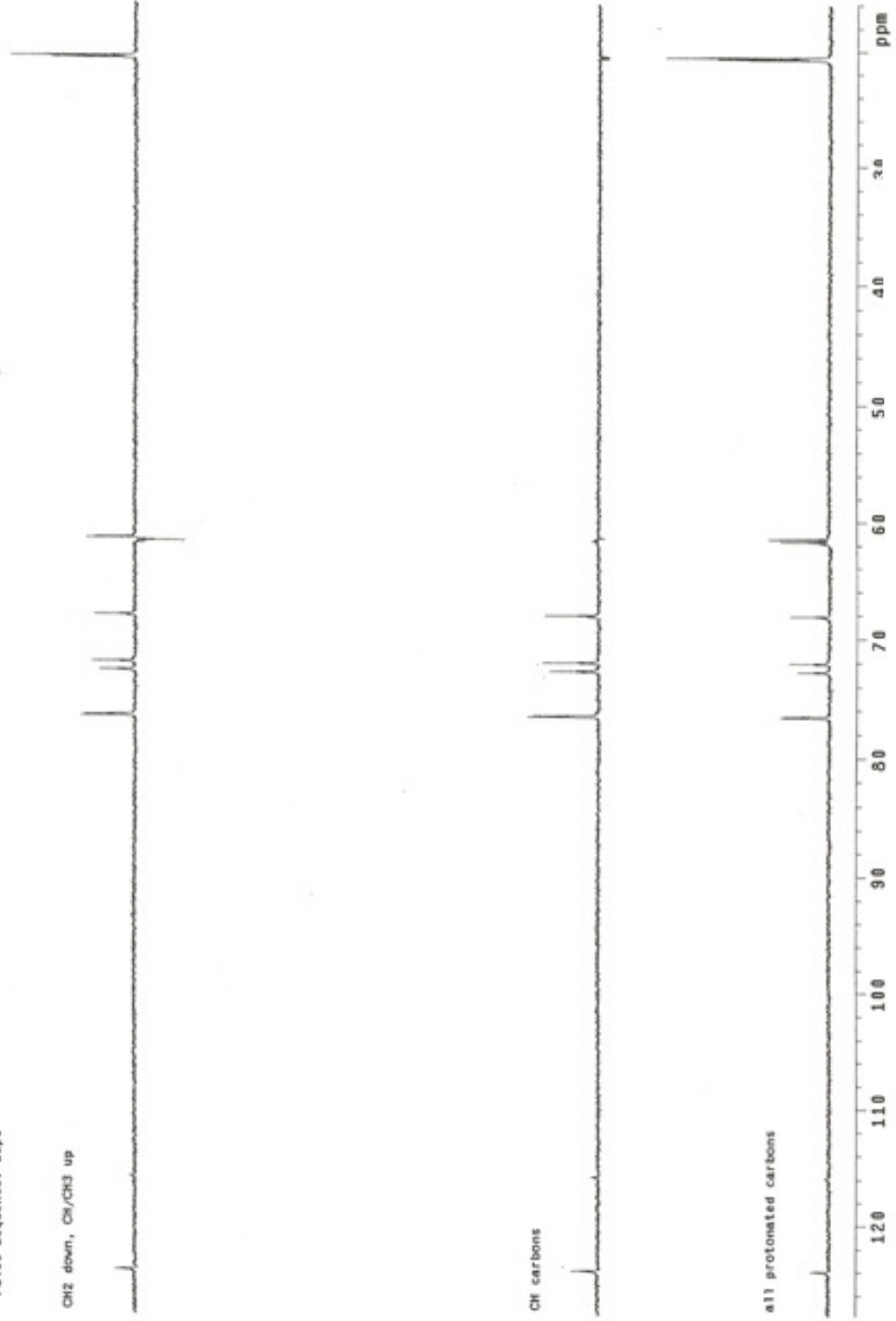
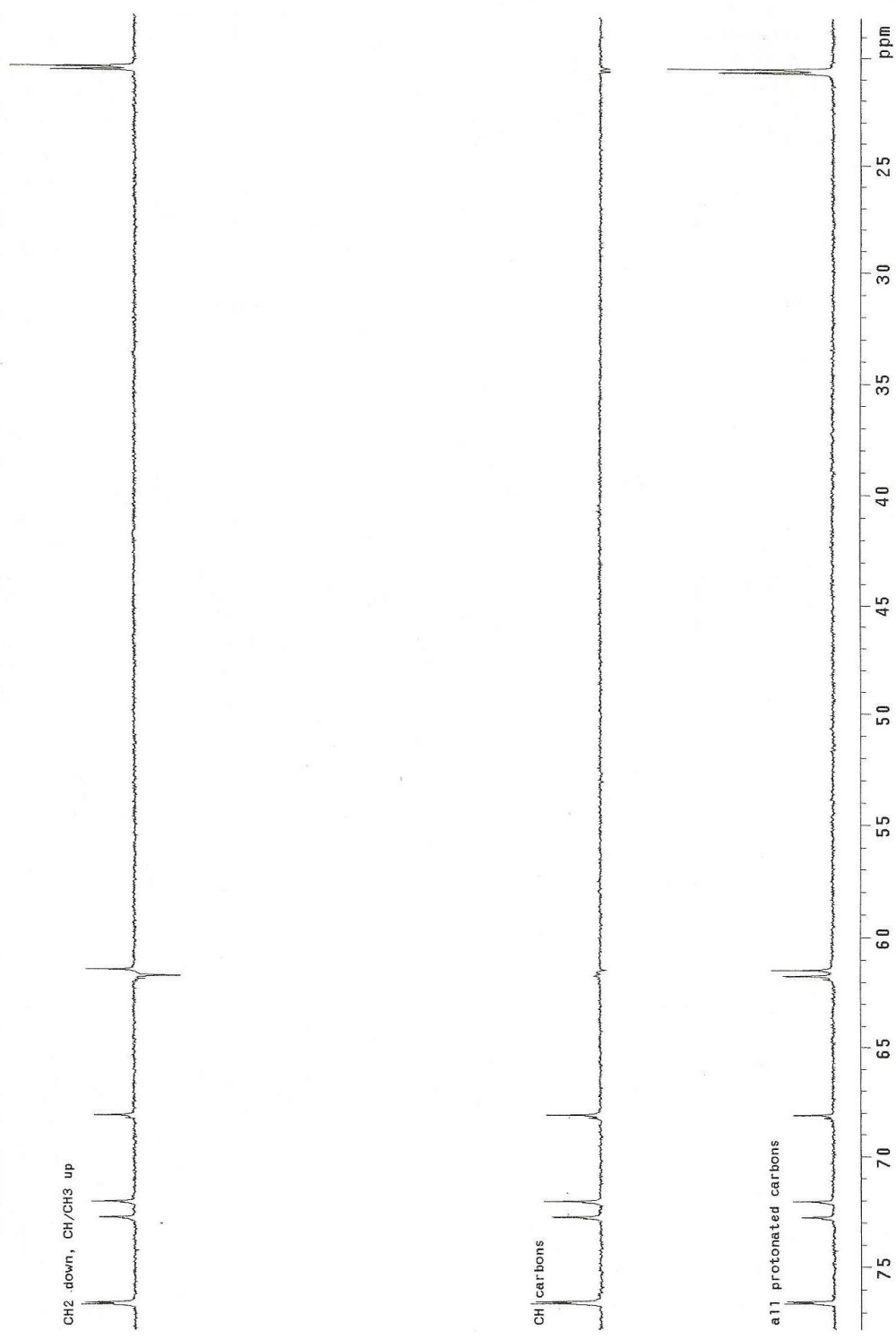


Figura 31- Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de S<sub>5</sub>



**Figura 32-** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT ( 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de  $\text{S}_5$

## **APÊNDICE B-Tabelas de dados farmacológicos**

**Tabela 6** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos.

Grupos (n=10)	Doses (mg/kg)	Número de Contorções	% de Inibição
Controle	-	62,8 ± 6,74	-
Acetilbergenina	1	45,10 ± 4,99*	28,18
Acetilbergenina	5	29,7 ± 3,65*	52,71
Acetilbergenina	10	24,40 ± 4,21*	61,15
Acetilbergenina	15	19,90 ± 3,18*	68,31
Acetilbergenina	25	3,10 ± 0,50* <sup>#</sup>	95,00
Indometacina	5	16,70 ± 4,30*	73,41

Cada valor representa a média ± E.P.M.

\**P* <0,05, quando comparado ao grupo controle; ANOVA, seguida do teste Student-Newman-Keuls.

<sup>#</sup>*P* <0,05, quando comparado ao grupo indometacina; ANOVA, seguida do teste Student-Newman-Keuls.

**Tabela 7** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg) sobre o tempo de latência em teste da placa quente à temperatura de 55 °C, em camundongos.

Grupos (n=10)	Doses (mg/kg)	Tempo após a administração (min.)				
		0	30	60	90	120
Tempo de Latência (s)						
Controle	-	10,20 ± 1,01	8,02 ± 1,02	9,14 ± 0,87	10,62 ± 0,97	10,16 ± 0,96
Acetilbergenina	6,8	8,65 ± 0,68	8,90 ± 1,15	7,96 ± 0,59	8,74 ± 0,84	7,58 ± 0,74
Morfina	10	10,18 ± 1,10	27,07 ± 1,12*	23,50 ± 1,89*	16,91 ± 2,67	10,39 ± 1,28

A latência que o animal leva para lamber as patas traseiras, agitar ou saltar fora da superfície foi expressa como média ± E.P.M. \**P* <0,05, quando comparado ao grupo controle; ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls.

**Tabela 8** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o estímulo nociceptivo químico induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na primeira (0-5 min.) e na segunda (15-30 min.) fases do teste.

Grupos (n=10)	Doses (mg/kg)	Tempo de lambida (s)		Inibição (%)	
		Primeira fase	Segunda fase	Primeira fase	Segunda fase
Controle	-	60,5 ± 5,13	206,9 ± 23,31	-	-
Naloxona	1	72,23 ± 4,33	225,50 ± 8,73	-	-
Morfina	4	22,8 ± 4,49*	6,0 ± 3,15*	62,31	97,10
Morfina + Naloxona	4 + 1	50,70 ± 3,53 <sup>#</sup>	134,20 ± 14,64	-	-
Acetilbergenina	6,8	54,75 ± 4,64	24,14 ± 8,3*	-	88,33
Acetilbergenina+Naloxona	6,8 + 1	64,24 ± 4,86 <sup>NS</sup>	207,22 ± 22,21 <sup>#</sup>	-	-

Cada valor representa a média ± E.P.M.

\* $P < 0,001$ , quando comparado ao grupo controle; Teste "t" de Student

<sup>#</sup> $P < 0,001$ , quando comparado agonista e antagonista versus agonista; Teste "t" de Student

NS, estatisticamente não significante quando comparado o agonista mais antagonista versus agonista.

**Tabela 9** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (100 µL/pata) até 5 h, em ratos.

Grupos	Doses (mg/kg)	média ± E.P.M e % de inibição									
		Intervalo de tempo (h)									
		1	2	3	4	5					
Controle	-	1,54±0,20	-	3,74±0,41	-	5,08±0,39	-	4,97±0,13	-	3,99±0,23	-
Acetilberg.	6,8	1,03±0,13	-	1,71±0,24*	54,28	2,71±0,14*	47,00	2,76±0,19*	44,47	2,59±0,24*	35,09
Indometac.	5	0,94±0,16	-	0,89±0,25*	76,20	1,73±0,18*	66,00	1,67±0,21*	66,40	1,44±0,16*	64,00

Edema do volume (mm) foi estimado em 1, 2, 3, 4 e 5 h após administração da carragenina. Valores foram expressos em média ± E.P.M. de 5 animais e percentagem de inibição do edema. \* $P < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, teste "t" de Student.



**Tabela 10** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre o edema de pata induzido por injeção intraplantar de dextrana (100 µL/pata) até 120 min., em ratos.

Grupos	Doses (mg/kg)	média ± E.P.M e % de inibição							
		Intervalo de tempo (min.)							
		30	60	90	120				
Controle	-	3,23± 0,19	3,23± 0,08	2,74±0,10	2,10±0,11				
Acetilbergenina	6,8	1,60± 0,30*	50,46	2,01±0,24*	38,00	1,64±0,24*	40,15	1,40±0,22*	33,33
Ciproheptadina	10	0,20 ± 0,20*	94,00	1,00 ±0,32*	69,04	0,80 ±0,20*	70,80	0,40 ± 0,24*	80,95

Edema do volume (mm) foi estimado em 30, 60, 90 e 120 minutos após administração da carragenina. Valores foram expressos em média ± E.P.M. de 5 animais e percentagem de inibição do edema. \* $P < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle, teste "t" de Student.

**Tabela 11** -. Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre a migração de neutrófilos, para a cavidade peritoneal, induzida por 3mL de carragenina (100 µg/mL) em ratos.

Grupos	Doses (mg/kg)	Número de neutrófilos x 10 <sup>6</sup> /mL	
		Média ± E.P.M.	Inibição (%)
Controle (n=6)	-	3893,25 ± 679,76	-
Acetilbergenina (n=4)	6,8	1169,50 ± 216,16**	70,00
Dexametasona (n=6)	0,5	224,66 ± 40,41***	94,23

\*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$  quando comparado ao grupo controle. ANOVA, seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

**Tabela 12** - Efeito da administração de acetilbergenina (6,8 mg/kg, v.o.) sobre a dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos

Grupos (v.o.)	Doses (mg/kg)	Média ± E.P.M.	% de inibição
Controle (n=9)	-	3,77± 0,64	-
Acetilbergenina (n=7)	6,8	0,92 ± 0,21	75,60 <sup>***,a</sup>
AAS (n=9)	100	0,81 ± 0,29	78,51 <sup>***</sup>

<sup>\*\*\*</sup> $P < 0,001$ , quando comparado ao grupo controle; <sup>a</sup> $P > 0,05$ , quando comparado ao grupo tratado com AAS (ANOVA, seguida do Teste de Student–Newman-Keuls). AAS: Ácido acetilsalicílico.