

**FERNANDA LÚCIA PASSOS FUKAHORI**

**BIOENSAIOS E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
SEMENTE DE SUCUPIRA BRANCA (*Pterodon emarginatus*, Vogel),  
UTILIZANDO CAMUNDONGOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
OSTEOARTRITE**

**RECIFE  
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**FERNANDA LÚCIA PASSOS FUKAHORI**

**BIOENSAIOS E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
SEMENTE DE SUCUPIRA (*Pterodon emarginatus*, Vogel), UTILIZANDO  
CAMUNDONGOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
OSTEOARTRITE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito final para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Doutora: Evilda Rodrigues de Lima.

Co-Orientador: Prof. Doutor: George Chaves Jimenez.

Recife  
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**BIOENSAIOS E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA  
SEMENTE DE SUCUPIRA (*Pterodon emarginatus*, Vogel), UTILIZANDO  
CAMUNDONGOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE  
OSTEOARTRITE**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**FERNANDA LÚCIA PASSOS FUKAHORI**

Aprovada em: ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> . Evilda Rodrigues de Lima  
Orientador – Departamento de Med. Veterinária da UFRPE

Prof Dr. George Chaves Jimenez  
Co-Orientador- Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Maria Bastos de Souza  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que fazem parte da minha família, que me ajudaram a concluir essa fase tão importante da minha vida, dedico esse trabalho a Família Passos, a Família Fukahori, a Família Passos Fukahori e a Família UFRPE.

## **AGRADECIMENTO**

**Agradeço a Deus por ter colocado no meu caminho verdadeiros heróis;**

**Heróis como meus avós que apesar de todas as dificuldades enfrentadas, educaram todos os seus seis filhos divinamente...**

**Heroína como minha mãe, que há quase 30 anos assumiu a decisão de criar suas duas filhas sozinha e o fez de maneira invejável por todos que a rodeavam...**

**Como minha irmã, que apoia minhas ideias malucas e vibra com elas...**

**Como meu marido que sempre foi meu fã nº 1 e sempre apostou em mim tudo que tinha...**

**Como meus filhos que por me amarem sem questionar minhas ausências, meus estresses, meus maus-humores...**

**Como minhas amigas, que mesmo enfrentando problemas pessoais doaram no mínimo um sorriso de apoio me fazendo cada dia mais forte...**

**Como minha Orientadora e amiga, que superou seus medos, suas dores e se reinventou para tornar o meu sonho de ser mestre possível...**

**Como meu Co-orientador e também amigo que, ignorou as limitações do seu corpo, de sua saúde frágil e embarcou de cabeça nessa utopia científica tornando-a real...**

**Como os amigos do laboratório de Farmacologia que me ensinaram muito, principalmente no que diz respeito à determinação, ao companheirismo, pois foi assim que conseguimos desenvolver esse trabalho e também me ensinaram que os verdadeiros heróis de todas as pesquisas são os nossos animais, neste caso, os camundongos.**

**Sou eternamente grata a todos!**

**Meus sinceros agradecimentos ao LANAGRO por ter me cedido gentilmente os camundongos para podermos realizar essa pesquisa.**

## RESUMO

A sucupira é uma árvore de copa larga que a medicina popular utiliza como alternativa de tratamento para diversas enfermidades, destas são conhecidas às ações do óleo essencial extraído de suas folhas, casca do tronco, tubérculos ou raiz, porém o uso da sua semente ainda é pouco discutido na comunidade científica. Objetivando determinar o potencial anti-inflamatório, potencial analgésico, sua quantidade mínima necessária para estabelecer sua ação, sua toxicidade e a indução na formação do fibroblasto, realizou-se este experimento, no laboratório de Farmacologia da UFRPE com seis grupos de camundongos que receberam a fração orgânica do extrato de sucupira branca (FOESSB) em doses diferentes em dias alternados, onde foi possível determinar a dose de trabalho e com outros grupos de camundongos que foram pré-tratados com alguns fármacos e com a FOESSB, mediante simulação de artrite inflamatória. Os bioensaios de atividade espontânea revelaram que a FOESSB proporcionou um elenco de respostas comportamentais característico, sinalizando efeitos estimulantes e depressores sobre o SNC, efeitos sobre o SNA além de outros efeitos diversos, muito embora, pelas relações de dose efeito encontradas em respostas associadas a importantes efeitos sobre o SNC, recomenda-se que para futuros trabalhos sejam empregadas doses inferiores a 385,71 mg/Kg. A FOESSB, na dose utilizada reduziu a inflamação de forma significativa, não provocou alterações importantes em teste de ansiedade, reduziu as respostas pró-inflamatórias associadas ao processo de incapacitação articular induzido por Ovalbumina, reduziu de forma significativa as mudanças no limiar de excitabilidade à respostas álgicas, em modelo de placa quente a 55°C e as avaliações bioquímicas dos parâmetros TGO, TGP, FA, ureia e creatinina revelaram que o estímulo antigênico teve, bem provavelmente, uma participação efetiva na elevação de todos estes parâmetros, com exceção dos níveis de ureia que estavam bem abaixo do esperado, em relação aos valores referenciais encontrados na literatura para os mesmos parâmetros em camundongos Swiss sadios e finalmente, não foram encontradas diferenças significativas na avaliação macroscópica e pesagens efetuadas sobre órgãos dos camundongos, retirados após eutanásia.

Palavras Chaves: faveiro, plantas medicinais, fitoterapia, artrites

## ABSTRACT

The sucupira is a large canopy tree that folk medicine used as an alternative treatment for various diseases, these are known to the actions of the essential oil extracted from the leaves, stem bark, root or tuber, but the use of his seed is still rarely discussed in the scientific community. Aiming to determine the potential anti-inflammatory, analgesic potential, their minimum amount necessary to establish its action, toxicity and induction in the formation of fibroblasts, this experiment was conducted in the laboratory of Pharmacology UFRPE with six groups of mice receiving the fraction organic extract sucupira white (FOESSB) at different doses on alternate days, where it was possible to determine the dose and work with other groups of mice were pre-treated with some drugs and the FOESSB by simulation of inflammatory arthritis. Bioassays of spontaneous activity revealed that FOESSB provided a list of behavioral responses characteristic signaling and stimulating effects on the CNS depressant effects on the ANS and other miscellaneous purposes, though, the dose effect relationships found in responses associated with important CNS effects, it is recommended for further studies are employed doses lower than 385.71 mg / kg. The FOESSB, the dose reduced inflammation significantly, did not significantly change in test anxiety, reduced pro-inflammatory responses associated with the process of joint incapacitation induced by ovalbumin, significantly reduced the changes in the excitability threshold responses painful in the hot plate model 55oC and biochemical evaluations of parameters AST, ALT, ALP, urea and creatinine revealed that the antigenic stimulus had and probably effective participation in the rise of all these parameters, except for the levels of urea that were well below expectations in relation to the reference values in the literature for the same parameters in healthy Swiss mice and finally, there were no significant differences in macroscopic evaluation and weighing performed on organs of mice and removed after euthanasia.

Key Words: faveiro, medicinal plants, herbal medicine, arthritis

## LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
a.C	antes de Cristo
BK	Bradicinina
COX	Cicloxygenase
DAD	Doença Articular Degenerativa
DL50	Dose Letal a 50 %
DMFA	Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
DMV	Departamento de Medicina Veterinária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FA	Fosfatase Alcalina
FOESSB	Fração Orgânica do Extrato da Semente de Sucupira Branca
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HETE	Ácido Hidroxieicosatetraenoico
HPETE	Ácido Monohidroperoxidoeicosateraenoico
I.P	Intraperitoneal
IL-1	Interleucina – 1
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina – 8
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LOX	Lipo-oxigenase

LPS	Lipopolissacarideo
LT	Leucotrieno
MCP	Proteína Quimiotática
MIP	Proteínas Inflamatórias
O <sub>2</sub>	Oxigênio
ONU	Organização das Nações Unidas
PAF	Fator Ativador Plaquetário
PCR	Proteína C Reativa
PFAg	Proteínas de Fase Aguda
PGS	Prostaglandinas
RFAg	Reação de Fase Aguda
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TGF	Fator de Crescimento Transformante
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Piruvica
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TX	Tromboxanos
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.2.1	Efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central– SNC, Efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônômico – SNA e outros efeitos observados em camundongos sob atividade espontânea, que receberam em dose única diferentes doses de FOESSB	49
Tabela 5.2.2	Percentual de efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central – SNC, efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônômico – SNA e outros efeitos observados em camundongos sob atividade espontânea, que receberam em dose única diferentes doses de FOESSB.	49
Tabela 5.2.3	Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos estimula estimulantes sobre o SNC. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.	54
Tabela 5.2.4	Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos depressores sobre o SNC. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.	57
Tabela 5.2.5	Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos sobre o SNA. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.	59
Tabela 5.2.6	Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam outros efeitos em animais que receberam a FOESSB. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito.	61
Tabela 5.3.1	Avaliação da atividade anti-inflamatória. Peso do fígado e do baço, além do peso do disco de algodão hidrófilo implantado subcutaneamente (10mg), avaliado 7 dias após o tratamento.	63
Tabela 5.3.2	Razão de massas (g/g de peso corpóreo) para o fígado e o baço dos grupos tratados e controle provenientes dos bioensaios de atividade antiinflamatória.	64
Tabela 5.3.3	Número de bolinhas cobertas por maravalha das gaiolas de ambos os grupos de animais tratados com a FOESSB e animais do grupo controle.	64
Tabela 5.4.1	Resposta após o 7º dia de tratamento dos animais com incapacitação articular induzida por Ovalbumina ao teste de ansiedade. Grupos controle, Grupo com animais tratados diariamente com dexametazona (5mM ip), Grupo com animais tratados com Celecoxib (5mM ip) e grupo com os animais tratados com a FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg, n = 9 em cada grupo.	66

Tabela 5.4.2	Tempo de resposta à sensibilidade das patas de camundongos submetidos ao modelo de placa quente para avaliação da extensão da resposta analgésica. Grupos de animais controle, animais pré-tratados com Dexametazona (5mM ip), animais pré-tratados com Celecoxib (5mM ip) e animais tratados com a FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg.	68
Tabela 5.4.3	Tempos de resposta dos animais de diferentes grupos de tratamento em teste do plano inclinado. Uma avaliação da condição de recuperação dos efeitos da incapacitação articular induzida por Ovalbumina.	70
Tabela 5.4.4	Valores medios e respectivos desvios do peso dos órgãos de animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.	72
Tabela 5.4.5	Valores medios relativos do peso dos órgãos de animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.	73
Tabela 5.4.6	Valores percentuais de afetamento sobre o peso dos órgãos em relação ao peso dos respectivos animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	Celecoxib	41
Figura 4.2	Dexametazona	41
Figura 4.3	Extrato de sucupira	41
Figura 4.4	Ovoalbumina	41
Figura 4.5	Semente de sucupira	42
Figura 4.6	Sementes trituradas	42
Figura 4.7	Extrato hidroalcoólico da semente de sucupira	42
Figura 4.8	Administração do extrato hidroalcoólico de sucupira	43
Figura 4.9	Disco de algodão	45
Figura 4.10	Teste de ansiedade	45
Figura 4.11	Teste de analgesia	46
Figura 4.12	Teste de incapacitação articular	47
Figura 5.2.1	Trajectoria do tipo de efeito, em termos percentuais, conforme a dose empregada da FOESSB	50
Figura 5.3.1	Comparação do peso dos discos de algodão implantados nos animais dos grupos controle e tratado com a FOESSB nos bioensaios para avaliação da atividade antiinflamatória	64
Figura 5.3.2	Percentagem de resposta positiva em animais dos grupos tratados com FOESSB e controle frente ao teste de ansiedade	65
Figura 5.4.1	Percentual de resposta em teste de ansiedade dos animais com incapacitação articular submetidos à diferentes condições de tratamento	67
Figura 5.4.2	Tempo medio de resposta de animais provenientes de diferentes condições de tratamento em teste de analgesia em modelo de placa quente a 55°C.	69
Figura 5.4.3	Tempos de resposta em teste de plano inclinado, de animais com incapacitação articular induzida por Ovalbumina, sob diferentes condições de tratamentos.	71

Figura 5.4.4	Níveis de ureia plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.	74
Figura 5.4.5	Níveis de creatinina plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.	75
Figura 5.4.6	Níveis de transaminase TGO plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.	76
Figura 5.4.7	Transaminase TGP plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.	77
Figura 5.4.8	Fosfatase alcalina plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.	78

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
2	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
2.1	<b>GERAL</b>	<b>18</b>
2.2	<b>ESPECÍFICOS</b>	<b>18</b>
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>20</b>
3.1	Fitoquímica no mundo	20
3.2	O uso das plantas medicinais no Brasil	21
3.3	Fitoquímica na veterinária	23
3.4	Pterodon	23
3.5	Atividades farmacológicas	26
3.6	Processo doloroso	27
3.7	Resposta inflamatória	29
3.7.1	Consumo do Ácido Araquidônico	31
3.7.2	Citocinas	33
3.8	Sistema Músculo Esquelético	34
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>41</b>
4.1	Animais	41
4.2	Drogas	42
4.3	Obtenção dos extratos da semente de sucupira	43
4.4	Bioensaios de atividade espontânea e teste de Toxicidade	44
4.5	Determinação do potencial anti-inflamatório	45
4.6	Bioensaios para a avaliação do potencial de recuperação da incapacitação articular induzida	47
4.7	Análise estatística	49
5	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
5.1	Algumas considerações sobre o extrato da semente de sucupira	50
5.2	Atividade espontânea em camundongos estimulados com a fração orgânica do extrato da semente de sucupira branca – FOESSB	50
5.3	Atividade anti-inflamatória	64
5.4	Bioensaios para avaliação do potencial de recuperação em modelos de incapacitação articular induzida por Ovalbumina	67
6	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>81</b>
7	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>84</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O homem durante o processo de evolução utilizou-se de diversas maneiras os recursos oferecidos pela natureza com a finalidade de buscar condições para sua sobrevivência e a melhor adaptação no meio em que vive. O desenvolvimento humano veio da necessidade de compreensão da relação homem/natureza e domínio do universo para o uso em seu próprio benefício (MIGUEL E MIGUEL, 1999; DI STASI, 1996; TEIXEIRA, 1994).

No decorrer dos milênios o homem ainda busca soluções para vários problemas de saúde. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, 80% da população de reduzido poder aquisitivo não tem acesso à medicina moderna e medicamentos essenciais, recorrendo aos produtos de origem natural como única fonte terapêutica (DI STASI, 1996). Atualmente, as descobertas de várias substâncias de origem vegetal, indicada pelo uso popular, tiveram suas atividades farmacológicas cientificamente comprovadas (MIGUEL E MIGUEL, 1999) e acredita-se que 70% dos medicamentos derivados de plantas tenham sido desenvolvidos com base no conhecimento folclórico (GARCIA et al., 2002).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, tanto para a obtenção de fármacos, que são as substâncias ativas isoladas, como para a obtenção de adjuvantes, produtos utilizados na formulação de medicamentos, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente, à base de extratos vegetais: os medicamentos denominados de fitoterápicos (SIMÕES et al., 1999).

Segundo Martins (1995, apud Souza et al., 2002) o metabolismo especial possui função ligada à ecologia da planta, isto é, ao relacionamento da planta com ambiente que a envolve. Um composto é biologicamente ativo quando exerce uma ação específica sobre um determinado ser vivo que pode ser um animal, um vegetal, ou um microrganismo. Uma vasta gama de compostos orgânicos naturais de origem vegetal, produtos do metabolismo primário e secundário, possui atividade biológica, isto é, pode ter ação tranquilizante, analgésica, anti-inflamatória, citotóxica, anticoncepcional, antimicrobiana, antiviral, fungicida e inseticida (PLETSCH, 1998).

Um dos maiores problemas de Saúde Pública, enfrentados nas últimas décadas, foi o agravamento da resistência a antimicrobianos em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2001). Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis aos fármacos de rotina usados na clínica, mas que se apresentam agora resistentes a todos ou quase todos os fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (SAKAGAMI E KAJAMURA, 2006).

Atualmente, o problema da resistência microbiana tornou-se mais grave devido às dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos, quase sempre mais escassos e mais caros. Estima-se que são necessários mais de 10 anos, a um custo superior a 200 milhões de dólares, para que um antimicrobiano esteja à disposição da população (DICKSON E REDWOOD, 1998).

Uma das alternativas usadas pelas indústrias farmacêuticas têm sido a modificação química da estrutura dos antimicrobianos já existentes, na tentativa de torná-los mais eficientes ou de recuperar a atividade prejudicada pelos mecanismos bacterianos de resistência (CHARTONE-SOUZA, 1998). A mudança de paradigma pode ser uma das saídas futuras para o impasse, ao pesquisar em primeiro lugar o alvo e só depois preparar o princípio ativo contra ele, por técnicas de biologia molecular, neste sentido a nanotecnologia vem a cada dia adquirindo maiores investimentos. Entretanto, as alternativas ecológicas, que enfatizam o respeito pelo meio ambiente, devem ser mais efetivas e de menor custo, uma vez que se baseiam no uso mais cuidadoso de alguns ambientes. Por outro lado, torna-se relevante a pesquisa da ação inibitória do crescimento bacteriano ou do fluxo gênico de resistência ou mesmo de reversão dessa resistência com o uso de produtos de origem natural (LINDEN E PALADINO, 1998; BROWN, 1999).

Na busca de novos antimicrobianos devemos enfatizar aqueles de origem vegetal, uma vez que o Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta e que muitas plantas já vêm sendo vastamente usadas e testadas há centenas de anos com as mais diversas finalidades por populações do mundo inteiro. A maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase que exclusivamente de medicamentos de origem natural (FUNARI E FERRO, 2005). Para isso, antes da determinação das frações ativas por métodos bioquímicos sofisticados, agora disponíveis, torna-se necessário e útil o uso preliminar de métodos de triagem de domínio e usos populares como macerados, chás,

extratos aquosos, alcoólicos e outros, a fim de elucidar as principais atividades farmacológicas (CARVALHO, 2003).

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias, principalmente das populações mais carentes. Servem tanto à conhecida “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular destes países, como de matéria-prima para elaboração de anti-inflamatórios fitoterápicos ou extração de compostos químicos com atividade anti-inflamatória (FREITAS, 1999).

A fitoterapia é praticada, principalmente, pelas populações mais carentes, o que representa grande perigo à saúde, pois neste caso, sua utilização ocorre desconsiderando os aspectos relativos ao controle de eficácia e segurança. É indiscutível a necessidade de um maior e melhor controle para estes produtos, já que os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população (BENDAZZOLI, 2000). Sendo assim, neste trabalho o objetivo foi estudar a ação anti-inflamatória da semente de sucupira e o mecanismo de ação destas substâncias no modelo experimental de artrites em camundongos.

A sucupira-branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) é freqüentemente encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente no cerrado e na floresta semidecídua da bacia do Paraná (LEITE DE ALMEIDA E GLOTTLIEB, 1975; BARREIRA et al., 2002). É conhecida na medicina popular como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa, apresenta como sinônima botânica *Pterodon pubescens* Benth. É uma planta semidecídua, heliófita, seletiva xerófila, características de terrenos secos e arenosos do cerrado e de sua transição para floresta semidecídua, com tecido compacto e reverso, bastante dura, difícil de rachar, de longa durabilidade mesmo quando em contato com solo e umidade (LORENZI, 1992).

O efeito anti-inflamatório das sementes de *Pterodon emarginatus* foi comprovado por diferentes autores (SABINO et al., 1999; NUNAN et al., 2001; COELHO et al., 2004). O óleo da semente de *Pterodon pubescens* não apresentou atividade mutagênica (SABINO et al., 1999), embora estudos de DL50 (dose letal 50%) e observação de sintomas tóxicos agudos do óleo das sementes demonstraram possíveis riscos após utilização da planta (DA LUZ DIAS et al., 1995). Outros estudos toxicológicos confirmam que elevadas doses do óleo das sementes não produzem efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* (SABINO et al., 1999).

As características da sociedade moderna oferecem desafios que se estendem a varias dimensões, entre estas aos problemas de saúde tanto no domínio da espécie humana como também com relação aos animais domésticos. As mudanças de hábitos alimentares, de atividade comportamental tem favorecido o surgimento de novas patologias como também ampliado à ocorrência de patologias já conhecidas de algum tempo. Como é o caso das osteoartrites e outras doenças articulares nos animais domésticos.

Sabe-se, por outro lado, que o diagnóstico completo pode ser complexo e com restrições bem como os recursos disponíveis não eficazes para a promoção da recuperação dos organismos afetados, comprometendo a qualidade de vida dos mesmos. Neste sentido, verificou-se para este trabalho que a sucupira branca tem sido referendada, popularmente, como capaz de reduzir os efeitos nocivos das afecções articulares em humanos. Então levantou-se a hipótese de que seria possível, a redução dos efeitos indesejados de animais de laboratório com incapacitação articular induzida, tratados com a fração orgânica do extrato hidroalcolico da semente de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*, Vogel), na intenção de estabelecer os limites de toxicidade para uso do material em mamíferos, como descobrir as principais vias de ação farmacológicas associadas às principais respostas obtidas.

Espera-se com isto a obtenção de um produto que venha a somar-se, na pior das hipóteses, como coadjuvante aos tratamentos disponíveis, oferecendo um recurso mais eficaz para os casos não tratáveis com os recursos já disponíveis, mas também dentro de uma condição de custeio acessível para a maioria da população. A seguir, informações mais pormenorizadas sobre o vegetal requisitado serão disponibilizadas, bem como os objetivos, metodologia, resultados, discussão e conclusão, conforme orientação no sumário.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Contribuir para os estudos da atividade anti-inflamatória de produtos naturais de interesse para a Medicina Veterinária

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

3.2.1. Construir um hectograma para camundongos *Mus musculus*, albino suíço, estimulados com diferentes doses da fração orgânica do extrato hidroalcólico da semente de sucupira (*P. emarginatus*), i.p., tomando-se como referência os descritores clínicos de Malone (1983). Os níveis de toxicidade aguda e possíveis relações do tipo dose/resposta serão caracterizados.

3.2.2. Avaliar o padrão de variação dos principais efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central – SNC, efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo – SNA e outros efeitos, conforme a dose empregada nos bioensaios realizados no item 3.2.1.

3.2.3. Verificar o efeito da fração orgânica do extrato hidroalcólico da semente de sucupira em modelo de inflamação com camundongos *Mus musculus*, albino suíço; conjugando com teste de ansiedade;

3.2.4. Verificar o efeito da fração orgânica do extrato hidroalcólico da semente de sucupira em modelo de incapacitação articular mediado por ovalbumina, em camundongos *Mus musculus*, albino suíço; comparando-se com as respostas de camundongos no mesmo modelo de incapacitação tratados com dexametazona e celecoxib, mediante realização do teste da barra vertical.

3.2.5. Avaliar as respostas de analgesia nos animais do item 3.2.4 em modelo de placa quente, conjugado com teste de ansiedade.

3.2.6. Avaliar as transformações macroscópicas e variações de pesagens em órgãos como coração, fígado, rim, pulmão e baço nos animais do grupo 3.2.5 ao final do período de realização dos bioensaios.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Fitoquímica no mundo

Várias culturas têm explorado e utilizado as plantas para fins medicinais. A presença de plantas com propriedades medicinais em uma sepultura antiga no Iraque sugere o seu uso com finalidade terapêutica há mais de 60 mil anos. Os primeiros registros do uso de plantas provêm da China (~3000 a.C.), onde o Imperador ShenNung compilou o *Pen Tsao* (Compêndio de Matéria Médica Chinesa). Este livro teve várias edições subsequentes, e muitas das 1000 ou mais drogas descritas ainda são utilizadas na China (LANGMEAD E RAMPTON, 2001).

O Papiro de Ebers, descoberto em uma sepultura no Egito em 1862, data de 1550 a.C. e é o texto médico mais antigo a subsistir. O papiro contém centenas de medicamento à base de plantas, incluindo o sene para constipação, dentre outros. A prática mesopotâmica está descrita em placas de barro datando do século VIIa.C., indicando novamente recursos derivados de plantas, óleo de rícino e sene, como laxativos (LANGMEAD E RAMPTON, 2001).

Posteriormente, Teofrastus (370-287 a.C.), um botânico grego e pupilo de Aristóteles, e Dioscórides (40-90 a.C.), um cirurgião grego do exército de Nero, escreveram livros descrevendo o uso medicinal das plantas e seus produtos. Galeno (129-216 d.C.), médico grego, ampliou a obra de Dioscórides e preparou medicamentos vegetais combinados que hoje são conhecidos como preparações galênicas (COWEN E HELFAND, 1990).

Perto do final do primeiro milênio, e influenciada fortemente pelos escritos de Galeno, a medicina árabe produziu um grande número de medicamentos derivados de plantas. Ao mesmo tempo, apareceu o primeiro manuscrito médico saxão o qual descrevia muitos medicamentos herbais e suas indicações (LANGMEAD E RAMPTON, 2001).

Até o início do século XIX, cerca de 90% dos medicamentos disponíveis compreendiam plantas medicinais, mas devido às dificuldades no controle de qualidade desses extratos vegetais, do ponto de vista físico-químico, farmacológico e toxicológico, seus

derivados isolados ou quimicamente sintetizados predominaram no mercado (LAPA et al., 2000; CORRÊA et al., 2001).

Nos Estados Unidos, 24% das prescrições médicas utilizam um ou mais princípios ativos derivados de plantas e 2,5% utilizam o seu extrato bruto (CALIXTO et al., 1998).

Aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas que apostam na produção de fitoterápicos como um negócio lucrativo, uma vez que a utilização de plantas medicinais atinge um público cada vez maior (CALIXTO, 2005). O aumento do emprego dos produtos naturais traz consigo o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e toxicológico, o que é fato preocupante e também chama a atenção dos pesquisadores, uma vez que isto está acontecendo com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população, em todo país (ALICE et al., 1995).

### **3.2 O uso das plantas medicinais no Brasil**

Embora a fitoterapia já agregue um contingente apreciável de trabalhos realizados e publicados, constitui, ainda, um vasto campo para pesquisa. Nos últimos 10 anos, o número de publicações científicas, nos países latino-americanos, aumentou muito (CALIXTO, 2005). O interesse pela fitomedicina cresceu e está crescendo, devido à busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças, cujos cuidados baseiam-se no uso de medicamentos que apresentam uma série de efeitos colaterais e muitas vezes aliviam parcialmente os sintomas sem tratar a doença (ALICE et al., 1995).

No Brasil, aproximadamente 84% dos fármacos atualmente disponíveis no mercado são importados e 60% de todas as substâncias processadas são consumidas por 23% da população, fazendo com que os “medicamentos caseiros” à base de plantas medicinais sejam, ainda, a principal fonte de medicamentos para a maioria da população brasileira de baixa renda, a qual recorre às plantas medicinais para o tratamento dos seus males e enfermidades (ELISABETSKY E WANNMCHER, 1993; ELISABETSKY, 1999).

As plantas medicinais tornaram-se um tópico de importância global crescente nos últimos anos, tendo repercussões tanto sobre a saúde mundial quanto no comércio internacional. Nos últimos 10 anos, as plantas medicinais têm desfrutado de um renascimento e essa fase tem sido alimentada por muitos consumidores interessados na medicina preventiva e por desapontamento com os medicamentos alopáticos (MAHADY, 2001).

Na verdade, a origem trans-cultural das plantas medicinais e seu uso contínuo por séculos sugerem que ao menos alguns de seus constituintes possuem valor terapêutico. Apesar disso, o seu uso por mais de mil anos não garante sua eficácia ou sua segurança e, nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico e sua preconização, ou a autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais comprobatórias de que os riscos a que se expõe àqueles que a utilizam são suplantados pelos benefícios que possam advir (LAPA et al., 2000; LANGMEAD E RAMPTON, 2001).

O termo “óleo essencial” é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais frequente a destilação por arraste com vapor de água (CRAVEIRO, 1981).

De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Quimicamente, a maioria dos óleos voláteis são constituídos de derivados fenilpropanóides e terpenóides (mono - e sesquiterpenóides) (MANN, 1987; IKAN, 1991; SIMÕES et al., 1999).

As substâncias odoríferas em plantas foram consideradas por muito tempo como “desperdício fisiológico” (KNOBLOCH et al., 1986) ou mesmo produtos de desintoxicação, como eram vistos os produtos do metabolismo secundário (MOTHES, 1980). Os óleos essenciais possuem propriedades químico-ecológicas de inibição da germinação e de proteção contra predadores. Estão envolvidos na polinização, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura (CRAVEIRO E MACHADO, 1986; HARBORNE, 1993).

Os óleos essenciais têm demonstrado propriedades farmacológicas variadas (BRUNETON, 1991; SIMÕES E SPITZER, 2000): ação carminativa, antiespasmódica,

estimulante do apetite, cardiovascular, anestésica local, ação anti-inflamatória, antisséptica, antimicrobiana e atua sobre o sistema nervoso central. A toxicidade crônica dos óleos voláteis é pouco conhecida e ainda é necessário avaliar suas eventuais propriedades mutagênicas, teratogênicas e/ou carcinogênicas. A toxicidade aguda, entretanto, é mais conhecida. A toxicidade dos óleos essenciais é dependente da dose e da via de administração (BRUNETON, 1991; SIMÕES E SPITZER, 2000).

### **3.3 Fitoquímica na veterinária**

A Etnoveterinária é a ciência que envolve a opinião e o conhecimento das práticas populares utilizadas para o tratamento ou prevenção das doenças que acometem os animais (MATHIUS-MUNDY E MCCORKLE, 1989).

O futuro profissional médico veterinário é o estudante de hoje, e é nele que a Fitoterapia deve estar presente para que seja incentivada, o primeiro a conhecer o tratamento e reconhecê-lo como válido (ALMEIDA et al., 2006).

O uso de fitoterápicos tanto nos humanos quanto nos animais, vem aumentando constantemente, devido aos avanços ocorridos na área científica que comprovam e reconhecem os fitoterápicos como seguros, eficazes, pouco agressivos, de pouco efeito colateral e de baixo custo; com isso sua popularidade vem aumentando muito não só no Brasil como no mundo todo, segundo a ONU (Organização Mundial de Saúde) aproximadamente oitenta por cento da população mundial e oitenta e dois por cento do Brasil utilizam as plantas medicinais (FUNARI E FERRO, 2005).

### **3.4 Pterodon**

Dentre as espécies pertencentes à família Leguminosae, o gênero *Pterodon* apresenta interesse pela comunidade científica desde a descoberta do composto 14,15-epoxigeraniolgeraniol com ação anticercária e antimicrobiana “in vitro” (MAHJAN et al., 1970;

FASCIO et al., 1975). O gênero *Pterodon* compreende cinco espécies nativas do Brasil; *Pterodon abruptus*Benth, *Pterodon apparicioi*Pedersoli, *Pterodon polygalaeflorus*Benth, *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon pubescens*Benth. Neste trabalho, os autores optaram em realizar o estudo utilizando as sementes de *Pterodon emarginatus* muitas vezes indicada e utilizada pela população.

Estudos fitoquímicos do gênero *Pterodon* têm demonstrado a presença de alcalóides nas cascas das árvores (TORRENEGRA et al., 1989), isoflavonas e alguns triterpenos (MARQUES et al., 1998); diterpenos na madeira (FASCIO et al., 1975; ARRIAGA et al., 2000) e isoflavonas no óleo das sementes (BRAZ FILHO E GOTTLIEB, 1971). Apesar de existirem estudos sobre a atividade citotóxica de alguns diterpenos (HAYASHI et al., 1992; DIMAS et al., 1998) e sesquiterpenos (BEEKMAN et al., 1996; KUBO et al., 1996), existem poucos estudos toxicológicos a respeito do óleo essencial das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel (DA LUZ DIAS et al., 1995).

A sucupira-branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) é frequentemente encontrada em Minas Gerais, São Paulo, Tocantins, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, principalmente no cerrado e na floresta semi-decídua da bacia do Paraná (LEITE DE ALMEIDA et al., 1975; BARREIRA et al., 2002).

*Pterodon emarginatus* Vogel conhecida na medicina popular como faveiro, sucupira-branca, fava-de-sucupira, sucupira ou sucupira-lisa, apresenta como sinonímia botânica *Pterodon pubescens*Benth. É uma planta semi-decídua, heliófita, seletiva xerófila, características de terrenos secos e arenosos do cerrado e de sua transição para floresta semi-decídua. Sua dispersão é irregular e descontínua, ocorrendo em agrupamentos densos e, muitas vezes até em populações puras. Um dos seus principais usos justifica-se pela sua madeira, considerada pesada (densidade 0,94 g/cm<sup>3</sup>), com tecido compacto e revesso, bastante dura, difícil de rachar, de longa durabilidade mesmo quando em contato com solo e umidade (LORENZI, 1992).

Sua madeira, geralmente, é utilizada em construção civil e naval, pilares de pontes, postes, dormentes, assoalho de vagões e de carrocerias, carvão e lenha. A árvore é ornamental, porém, infelizmente ainda não foi devidamente aproveitada para o paisagismo; apesar de seu lento crescimento, pode ser usado com sucesso na arborização de ruas e praças. Como planta tolerante à luz direta e pouco exigente em solos, não pode faltar nos

reflorestamentos mistos destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 1992).

A planta inteira é empregada na medicina popular em toda região de sua ocorrência natural. A casca produz um óleo volátil e aromático, muito eficiente no tratamento do reumatismo, possivelmente o mesmo encontrado nos alvéolos das sementes. As túberas radiculares ou “batatas-de-sucupira” são empregadas no tratamento de diabetes (MORS et al., 1967).

Trata-se de uma árvore de grande porte de copa piramidal e rala, com altura de 8-16 metros, com tronco cilíndrico de 30-40 centímetros de diâmetro revestido por casca lisa de cor branco-amarelada. Suas raízes ocasionalmente formam expansões ou túberas denominadas de “batata-de-sucupira”, constituindo-se em órgãos de reserva da planta. Possuem folhas compostas pinadas, com 20-36 folíolos de 3-4 centímetros de diâmetro e flores de cor rosada, dispostas em inflorescências paniculadas terminais. Os frutos são vagens tipo sâmara, arredondado, indeiscente e alado, contendo uma única semente fortemente protegida dentro de uma cápsula fibro-lenhosa e envolvida externamente por uma substância oleosa numa estrutura esponjosa como favos de mel (LORENZI E MATOS, 2000).

Além disso, a espécie também é frequentemente confundida na medicina tradicional com a espécie *Bowdichia virgiloides* Kunth, morfológicamente bem diferente daquela, principalmente com relação aos frutos (vagens), porém com os mesmos nomes populares. A espécie *Pterodon emarginatus* Vogel, produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, que eventualmente podem ser atacadas por insetos e sua floração ocorre durante os meses de setembro – outubro e a maturação dos frutos verificam-se nos meses de junho – julho com a planta já quase totalmente despida da folhagem; permanecendo, entretanto, na árvore por mais algum tempo.

As sementes podem ser obtidas colhendo-se os frutos diretamente da árvore quando iniciarem a queda espontânea, ou recolhê-los no chão após a queda. Os frutos assim obtidos podem ser diretamente utilizados para a sementeira, ou abertos manualmente para a retirada da semente; essa seria a situação ideal, entretanto, como é uma operação trabalhosa, pode-se cortar uma de suas extremidades e semeá-los dessa forma. Um quilograma de frutos contém, aproximadamente, 1200 unidades (LORENZI, 1998).

Embora apresente variadas atividades farmacológicas, extratos hidroalcoólico das sementes das espécies pertencentes ao gênero *Pterodon*, são muito utilizados pelas suas atividades anti-reumática, analgésica, anti-inflamatória, quando ingeridos por via oral, em quantidades pequenas com doses regulares (COELHO et al., 2005) e hipoglicemiante (MACEDO; FERREIRA, 2004). O uso popular do seu óleo, com efeito antirreumático, tem sido relatado em livros brasileiros sobre plantas medicinais durante muito tempo (COIMBRA, 1942; CRUZ, 1965). Além disso, a atividade antirreumática do extrato hidro alcoólico das sementes de *Pterodon pubescens* demonstrou aumento na produção de colágeno na artrite em camundongos *Swiss* (SABINO et al., 1999).

O efeito anti-inflamatório das sementes de *Pterodon emarginatus* foi comprovado por diferentes autores (SABINO et al., 1996; NUNAN et al., 2001; COELHO et al., 2004). O óleo da semente de *Pterodon pubescens* não apresentou atividade mutagênica (SABINO et al., 1999b), embora estudos de  $DL_{50}$  (dose letal para promover a morte de 50% de um grupo de animais experimentais estimulados), e observação de sintomas tóxicos agudos do óleo das sementes demonstraram possíveis riscos após utilização da planta (DA LUZ DIAS et al., 1995). Outros estudos toxicológicos confirmam que elevadas doses do óleo das sementes não produzem efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* (SABINO et al., 1999).

### **3.5 Atividades farmacológicas**

O oxigênio é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO). Estas abrangem moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, ou seja, ocupando um orbital atômico ou molecular sozinho, também conhecido como radical livre. Os radicais livres são extremamente instáveis, extraordinariamente reativos, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular e derivado de cada uma delas. ERO é um termo frequentemente usado para incluir também espécies que não são radicais livres, mas algumas moléculas derivadas de  $O_2$  (oxigênio), capazes de gerar radical livre, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

O O<sub>2</sub> envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em ânion superóxido, radical hidroxil, oxigênio *singlete* peróxido de hidrogênio, e todas essas variações estão muitas vezes associadas a circunstâncias patológicas, incluindo processos inflamatórios. Entretanto, também estão relacionadas a processos fisiológicos como, por exemplo, a resposta imune. Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lípidos, ácidos graxos e as proteínas (STORZ et al., 1987). O oxigênio atmosférico é o principal agente responsável pela deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar. Diversas classes de moléculas são susceptíveis ao ataque de O<sub>2</sub> e acabam formando hidroperóxidos. Tais hidroperóxidos contribuem para a deterioração e disfunção em células e membranas celulares (LARSON, 1988).

As EROs podem direcionar a produção de mais espécies reativas, articularmente através de processos endógenos, acontecendo em muitas células como consequência dos processos metabólicos. Também podem ser formadas pela exposição de células à radiação ionizante, pelo ciclo-redox químico presente no ambiente ou pela exposição a metais pesados (BRENNAN E SCHIEST, 1996).

Apesar destes mecanismos, todos os organismos aeróbios estão continuamente expostos a oxidantes reativos, ocorrendo estresse oxidativo, onde a concentração destes oxidantes aumenta a capacidade de tamponamento antioxidante da célula. Dados os prejuízos naturais das EROs, a maioria dos organismos têm desenvolvido meios para proteção dos seus constituintes celulares contra os oxidantes reativos (GASPARRI, 2005).

### **3.6 Processo doloroso**

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudos da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (DICKENSON E BESSON, 1997). É importante salientar que sempre que qualquer tecido estiver lesado, o organismo reage para desencadear o estímulo doloroso como um mecanismo de proteção (GUYTON E HALL, 2002; MILLAN, 2002). Entretanto, a dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do

estímulo nociceptivo ambiental, mas também cognitivo e emocional processado pelo cérebro (JULIUS E BASBAUM, 2001).

Os receptores da dor na pele e em outros tecidos estão presentes em terminações nervosas livres, sensíveis a estímulos dolorosos. A atividade no nociceptor e a via nociceptiva e outros processos neurofisiológicos induzidos pelo estímulo doloroso é chamado de nocicepção (DICKENSON E BESSON, 1997). A dor é usualmente desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). Entretanto, ela pode ser resultante de lesão nas fibras sensoriais, ou dano ocasionado no SNC (dor neuropática) (MILLAN, 1999). Além disso, segundo Dickenson e Besson (1997), algumas alterações podem ocorrer como o aumento da resposta a um estímulo normalmente doloroso o qual é denominado de hiperalgesia. Esta normalmente é decorrente de importantes mudanças no processo central de sinalização da dor. Outras alterações sensoriais também podem aparecer, entre elas a alodínia que se refere à dor evocada por estímulos inócuos (MILLAN, 1999).

A sensação de dor nos alerta para uma real ou provável lesão e desencadeia respostas apropriadas para proteger o organismo. Contudo, frequentemente a dor torna-se crônica e debilitante, em substituição a sua função de atuar como um sistema de aviso. A transmissão para a fase crônica envolve mudanças na medula espinhal e encéfalo, mas ocorre modulação significativa nos locais onde as mensagens da dor são iniciadas no nível do primeiro neurônio sensorial (JULIUS E BASBAUM, 2001). Neste sentido, existem várias fontes importantes onde os mediadores que participam da resposta nociceptiva são gerados como: tecido lesado, sistema vascular, células imunes, tecidos adjacentes, nervos sensoriais e simpáticos. Esses mediadores atuam em receptores amplamente distribuídos no organismo. Alguns desses receptores são acoplados à proteína G e induzem a formação de segundos mensageiros. Outros receptores são acoplados a canais iônicos que regulam a permeabilidade e a concentração celular de íons (DICKENSON E BESSON, 1997).

Alguns desses mediadores que estimulam o tipo químico de dor incluem: bradicinina (BK), serotonina (5-HT), histamina, íons potássio, ácidos, acetilcolina e enzimas proteolíticas. Além destas, as prostaglandinas (PGs) e a substância P (SP) acentuam a sensibilidade das terminações da dor (GUYTON E HALL, 2002; MILLAN, 2002). O método do tempo da lambida da pata é uma metodologia que melhor mimetiza a dor clínica e é constituída por duas fases dolorosas. A primeira fase é típica de uma ação em nível de sistema nervoso central, onde as sinapses que contêm receptores opióides constituem um dos mecanismos que

controla a dor. Fármacos como a morfina podem agir centralmente nesses receptores e diminuir o estímulo doloroso. A morfina, por ser um fármaco opióide, age na segunda fase (SHIBATA et al., 1989). A segunda fase é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores da inflamação. Esses mediadores são inibidos por fármacos anti-inflamatórios, tais como o ácido acetilsalicílico, indometacina e dexametasona (FARSAMet al., 2000).

O método de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% induz efeito doloroso e uma reação inflamatória aguda, devido à liberação de diversos mediadores semelhantes à citocinas e eicosanóides, por exemplo, aumento dos níveis de prostaglandinas E2 e F2 $\alpha$  no fluido peritoneal (DERAEDT et al., 1980). Adicionalmente, tem sido demonstrado que citocinas, semelhantes ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), estão envolvidos na resposta nociceptiva das contorções induzidas por ácido acético (RIBEIRO et al., 2000). No teste da placa quente (*hot plate*) avalia-se uma resposta antinociceptiva central específica, através dos antagonistas/receptores opióides supra-espinhais e espinhais (NEMIROVSKY et al., 2001). Neste modelo, a morfina é utilizada como padrão, já que causa analgesia por ativar as vias descendentes, por inibir a transmissão no corno dorsal e por inibir a excitação das terminações nervosas sensoriais na periferia (SHANNON E LUTZ, 2002).

### **3.7 Resposta inflamatória**

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de doenças inflamatórias, principalmente das populações mais carentes. Servem tanto à conhecida “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular destes países, como de matéria-prima para elaboração de anti-inflamatórios fitoterápicos ou extração de compostos químicos com atividade anti-inflamatória (FREITAS, 1999).

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o homem, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas inflamação. Na maioria das vezes, os mediadores inflamatórios como, por exemplo, produtos de leucócitos e plaquetas ativados, do

metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos) e das cascatas da coagulação e do complemento, têm localmente no sentido de restringir as consequências e a extensão do dano tecidual (ABBAS et al., 1994; ADAMS, 2003). Em condições em que a capacidade homeostática local é superada, ou pela magnitude do estímulo agressor ou pela insuficiência dos mecanismos reguladores, a resposta inflamatória extravasa os limites do seu microambiente e pode se manifestar de modo sistêmico em todo o organismo ou ainda, dependendo da quantidade de citocinas liberadas, pode ter consequências catastróficas, na forma de choque circulatório grave (ADAMS, 2003; ABBAS et al., 1994).

Atualmente, além das infecções, muitas outras formas de injúria tecidual, como trauma, isquemia, neoplasias e hipersensibilidade, desencadeiam alterações na concentração de várias proteínas plasmáticas, conhecidas como “proteínas de fase aguda” (PFAg). Elas constituem apenas uma parte da “reação ou resposta de fase aguda” (RFAg) que inclui febre, leucocitose e anormalidades metabólicas que produzem variada manifestação clínica e laboratorial. Na resposta inflamatória as várias PFAg exibem diferentes alterações na sua concentração sérica (muito ou pouco aumentada, ou mesmo diminuída) e propriedades biológicas. A magnitude, mas não a natureza, da resposta de fase aguda, medida pela concentração da proteína C reativa (PCR), depende do estímulo desencadeante. Quando este é autolimitado ou controlado por tratamento, a inflamação é inibida e as PFAg retornam à concentração fisiológica em dias ou semanas, podendo, de outra maneira, persistir ou recidivar, levando a um padrão de “RFAg crônica”, como ocorre em neoplasias, colagenoses e infecções crônicas (BALLOU e KUSNHER, 1993; BAUMANN e GAULDIE, 1994; ADAMS, 2003).

Independentemente da natureza do estímulo desencadeante, as células ativadas do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes e macrófagos teciduais) iniciam a cascata de eventos da RFAg, secretando, em uma etapa inicial, citocinas da família da interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Estas moléculas têm ação pleiotrópica, tanto a nível local como sistêmico. Localmente, agem sobre células da matriz ou estroma tecidual, principalmente fibroblastos e células endoteliais, causando a liberação de um segundo conjunto de citocinas que incluem, além dos próprios IL-1 e TNF, também interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8) e as proteínas inflamatória (MIP-1) e quimiotática (MCP) de macrófago. Esta última proteína, juntamente com IL-1, IL-8 e TGF- $\beta$  recruta para o foco inflamatório, monócitos e neutrófilos, os quais secretam um terceiro conjunto de

citocinas, incluindo o TNF e outros fatores quimiotáticos, que retro alimentam o processo inflamatório (STADNYK e GAULDIE, 1991; ADAMS, 2003).

O endotélio vascular desempenha papel central na comunicação entre o sítio inflamatório e os leucócitos circulantes, tanto pela expressão de moléculas de adesão (das famílias de ICAM e ELAM), que facilitam a migração tecidual de monócitos e neutrófilos, como pela modificação do tônus vascular mediado por metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos), pelo óxido nítrico e pelas cininas, causando vasodilatação (eritema), aumento da permeabilidade vascular (edema) e hipotensão arterial. A outra manifestação da inflamação, a dor, é mediada, além das prostaglandinas, pela bradicinina, um nonapeptídeo liberado pelo sistema cininogênio (também uma PFAg-cinina, que também participa da ativação da cascata da coagulação (BAUMANN e GAULDIE, 1994; STEEL e WHITEHEAD, 1994; ADAMS, 2003).

### **3.7.1. Consumo do Ácido Araquidônico**

O ácido Araquidônico é assim chamado porque deriva do ácido do amendoim, *Arachis hipogaea*. Trata-se de um ácido graxo insaturado. É o material inicial para a síntese de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e lipoxinas. O ácido araquidônico é um ácido graxo ômega-6 e um dos ácidos graxos mais comuns derivados dos fosfolipídios da membrana celular (Silva, 2006).

A cascata do ácido araquidônico é uma via metabólica do organismo que usa o ácido araquidônico para a síntese de uma grande panóplia de mediadores lipídicos de importância incontestável na fisiologia e patologia, globalmente denominados de eicosanóides e entre os quais se encontram: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos. A cascata do ácido araquidônico depende da oxidação deste composto lipídico e é divisível em duas vias principais: a dependente da ciclooxigenase (COX) e a dependente da lipo-oxigenase (LOX) (GOODMAN E GILMAN, 2007).

A importância da cascata do ácido araquidônico radica no conjunto de funções desempenhadas pelos seus produtos, os eicosanóides, na bioquímica das células. O seu papel mais notável será porventura o de via pró-inflamatória e de alvo terapêutico dos fármacos

anti-inflamatórios não esteróides, como a aspirina. Consequentemente, o controle e modulação da cascata do ácido araquidônico e das ações dos eicosanóides, quer fisiologicamente, quer iatrogenicamente, pode prevenir ou tratar uma vasta miríade de patologias do organismo, de entre as quais podemos enunciar: hipertensão arterial, hipertensão pulmonar, hipertensão ocular e glaucoma, úlcera gástrica, disfunção erétil, artrite reumatóide, asma (SILVA, 2006; GOODMAN E GILMAN, 2007) .

Os eicosanóides se formam quando a fosfolipase ou outras lipases são ativadas em determinado tecido, essa ativação pode ser provocada pela ação de um estímulo fisiológico (por exemplo, pela angiotensina, bradicinina, noradrenalina) ou por estímulo patológico (lesão tissular). Quando o ácido araquidônico é liberado da forma esterificada existente na membrana celular, ele é transformado em diversos produtos, pela ação de várias enzimas, representadas, principalmente, pelas ciclooxigenases e lipoxigenases (SILVA, 2006).

O ácido araquidônico pode ser oxidado pela enzima ciclo-oxigenase dando origem aos prostanóides, ou seja, às [prostaglandinas](#) e aos [tromboxanos](#). Porém, nem todas as prostaglandinas e tromboxanos têm como precursor o ácido araquidônico, esse é apenas o caso dos eicosanóides da série 2 (identificáveis por um numeral 2 subscrito; por exemplo: PGG<sub>2</sub>), as prostaglandinas e tromboxanos da série 1 são derivadas do [ácido eicosatrianóico](#) e os da série 3 do [ácido eicosapentaenóico](#), contudo, a síntese de todos os prostanóides depende da COX, uma vez que a enzima atua sobre qualquer um dos precursores (DEVLIN, 2005; SILVA, 2006; GOODMAN E GILMAN, 2007).

Os tromboxanos (TX: AeB) foram inicialmente descobertos como produtos do metabolismo do ácido araquidônico nas plaquetas sanguíneas ou trombócitos (SILVA, 2006).

Existem duas [isoenzimas](#) da COX: a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é constitutiva da maioria dos tecidos, mas com especial relevância para a mucosa gástrica, endotélio vascular, parênquima renal e plaquetas. Já a COX-2 é uma enzima de expressão induzível por mediadores pró-inflamatórios (como a [IL-1](#), o [PAF](#) ou o [LPS](#)) em [macrófagos](#) e [monócitos](#) (DEVLIN, 2005).

A via da lipo-oxigenase (LOX) é a segunda via, que com a da COX, forma a cascata do ácido araquidônico. Os produtos desta segunda via são os ácidos monohidroperoxidoeicosatetraenóicos (HPETEs), os ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e os leucotrienos (LTs), que, à semelhança dos prostanóides, são mediadores

lipícos. A principal ação estudada dos produtos desta via é a sua ação pró-inflamatória, à semelhança do que ocorre na via da ciclo-oxigenase, além do ácido araquidônico, outros ácidos graxos poli-insaturados (DGLA e ECA) podem sofrer ação da LOX, mas crê-se que os eicosanóides sintetizados a partir destes têm uma ação menos potente (DEVLIN, 2005; GOODMAN E GILMAN, 2007).

Os HPETEs são precursores instáveis que rapidamente dão origem a novos compostos. A maioria dos HPETEs reduz-se espontaneamente ou são reduzidos pela ação de uma peroxidase aos respectivos [ácidos hidroxieicosatetraenoicos](#) ou HETEs (5-HETE, 12-HETE e 15-HETE). O principal papel dos HETEs identificado até à data é a regulação da resposta inflamatória: são [quimiotáxicos](#), estimulam a [adenil ciclase](#) e medeiam a desgranulação dos leucócitos polimorfonucleados, por exemplo. O 5-HPETE: é o principal produto em basófilos, leucócitos polimorfonucleados, [macrófagos](#), [mastócitos](#) e qualquer tecido envolvido numa resposta inflamatória ((DEVLIN,2005; SILVA, 2006; GOODMAN E GILMAN, 2007).

Os leucotrienos são em geral substâncias pró-inflamatórias. Estão associados à estimulação da ação dos leucócitos - complementando o papel dos HETEs -, à contração do músculo liso - principalmente a nível brônquico e gastro-intestinal - e ao aumento da permeabilidade vascular - explicando o edema que acompanha uma resposta inflamatória (DEVLIN, 2005).

### **3.7.2 Citocinas**

As citocinas são importantes mediadores da defesa do hospedeiro contra infecções, lesões e inflamações aguda e crônica, que são liberadas por células e agem sobre linfócitos e macrófagos e outras células fora do sistema imune, sendo mensageiros proteicos que influenciam e interligam o sistema imune com os outros sistemas fisiológicos do organismo (SILVA, 2006; GOODMAN E GILMAN, 2007).

Alguns inibidores específicos de varias citocinas foram purificados a partir de fluidos corpóreos e incluem formas solúveis de receptores celulares, esses inibidores e drogas

correlatas podem servir de base de intervenção farmacológica das respostas imune e inflamatórias (GOODMAN E GILMAN, 2007).

A interleucina-1 (IL-1) é uma citocina que representa uma família de três citocinas que consiste em dois agonistas, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , e um antagonista endógeno do receptor IL-1 (IL-1RA), as moléculas da interleucina-1 são produzidas na presença de infecção e lesão ou numa provocação antigênica, sendo sua fonte primária os macrófagos ativados (SILVA, 2006;GOODMAN E GILMAN, 2007; ADAMS, 2003).

Todas as moléculas de interleucina-1 atuam em receptores específicos nos tecidos-alvos,a IL-1 é uma citocina pró-inflamatória importante, especialmente nas manifestações sistêmicas da inflamação, como a febre, por exemplo, participa de vários quadros patológicos, como artrite reumatoide, doença intestinal inflamatória, choque séptico e diversas doenças autoimunes (ADAMS, 2003).

### **3.8 Sistema Músculo Esquelético**

O tecido ósseo promove suporte para as partes moles, protege órgãos vitais, aloja a medula óssea, atua como um depósito de cálcio, fosfato e outros íons, proporciona apoio aos músculos esqueléticos e é constituinte do sistema de alavancas que ampliam as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA ET AL, 1990).

O sistema locomotor é constituído por ossos, articulações e músculos. O esqueleto de um animal vivo é constituído de ossos que são por sua vez estruturas vivas. Nos vertebrados, a locomoção, a defesa, o ataque, a força de pegar e segurar e outras atividades desse tipo dependem da ação dos músculos que se fixam às alavancas (FRANDSON,1979).

Neste conjunto, há também articulações, que unem os ossos, umas firmemente, outras unem de forma a permitir movimentos livres. As articulações podem ser classificadas: anatomicamente, de acordo com o seu modo de desenvolvimento, a natureza do meio de união e a forma das faces articulares; fisiologicamente, em relação à liberdade e ao grau de movimento, ou ausência deste; e por uma combinação das características das duas anteriores (GETTY,1986), estas podem ser: fibrosas, cartilaginosas – estas duas com pouca ou nenhuma

amplitude de movimento – e sinoviais, que permitem uma grande amplitude (DYRCE ET AL, 1985).

Nas articulações sinoviais, os ossos que se articulam são revestidos por uma camada de cartilagem; existe com frequência cavidade articular com líquido, envolta por a membrana sinovial. Complexos espessamentos desta membrana formam os ligamentos. Em alguns casos pode existir divisão da cavidade articular em duas outras por menisco (ROMER E PARSONS,1985).

Os ossos entram em contato uns com os outros através de articulações, sendo que algumas se destinam a promover uma união firme, enquanto outras permitem ampla movimentação. Assim, além das diferenças observadas no desenvolvimento, existe enorme variação quanto à estrutura das articulações, o que dificulta sua classificação. O sistema oficial atual reconhece três classes principais de articulação, as articulações fibrosas, em que os ossos são unidos por tecido conjuntivo denso, são relativamente imóveis ou mesmo rígidas; as articulações cartilagosas, em que a união dos ossos se dá através de cartilagens, são relativamente imóveis ou mesmo rígidas e as articulações sinoviais, onde os ossos são separados por um espaço preenchido por líquido, a cavidade articular(GETTY,1986; JUNQUEIRA et al., 1990).

Os limites do espaço são completados por um delicado tecido conjuntivo, a membrana sinovial. Esta se une à periferia das superfícies articulares, que são revestidas por finas camadas de cartilagem (DYRCE, 1990).

Na maioria das articulações sinoviais , no entanto, a membrana sinovial é reforçada externamente por uma cápsula fibrosa , enquanto cordões fibrosos (ligamento) adicionais são estrategicamente disposto para unir os ossos e limitar os movimentos à direção e ao grau exigidos (HICKMAN,1964).

A superfície articular é revestida por cartilagem articular, geralmente do tipo hialino, embora em alguns locais possa encontrar-se fibrocartilagem ou mesmo tecido fibroso denso. A cartilagem acentua a curvatura do osso que recobre sendo mais espessa no centro das superfícies convexas e na periferia das superfícies côncavas (DYRCE, 1990).

A cartilagem tem uma estrutura complexa na qual as finas fibras da matriz são dispostas em arco, cujos vértices dirigem-se para a superfície. Uma vez que ocorre o

rompimento da cartilagem, comum nas doenças articulares, tendem a seguir a direção das fibras, as lesões superficiais levam a formação de fragmentos rompidos tangencialmente, enquanto as lesões mais profundas ocasionam rupturas mais ou menos verticais(BRINKER,1986).

A cartilagem articular não é inervada nem irrigada. A insensibilidade explica por que as lesões articulares podem evoluir antes que o paciente as perceba. As necessidades nutritivas e de oxigênio são supridas a partir da difusão de três fontes o líquido na cavidade articular, vasos nos tecidos na periferia da cartilagem e vasos nos espaços medulares subjacentes. A difusão é facilitada pela porosidade da matriz cartilaginosa, que absorve e libera líquidos de acordo com a solicitação e a compressão da cartilagem durante os movimentos da articulação(GETTY,1986; DYRCE, 1990).

A membrana sinovial, que completa o revestimento da articulação, é uma camada brilhante de tecido conjuntivo de cor rosada. Pode estar totalmente livre, pode repousar diretamente sobre a resistente cápsula fibrosa externa ou pode estar separada desta pela interposição de coxins de gordura (DYRCE, 1990).

A superfície interna da membrana apresenta diversas projeções de tamanho variado o que permite um aumento da área superficial. Ao contrario das membranas mucosas, a membrana sinovial não apresenta um revestimento celular uniforme; as partes mais celulares, limitadas a regiões protegidas, são responsáveis pela produção do componente lubrificante (aminoglicanos) da sinóvia (GETTY,1986).

Os outros componentes são derivados do plasma. A membrana é irrigada e enervada. A sinovial tem funções nutritivas e lubrificantes bastante eficientes, pois a grande fricção exercida praticamente não acarreta desgaste algum em articulações normais (DYRCE, 1990).

A membrana fibrosa externa completa a cápsula, se fixa as margens das superfícies articulares e apresentam espessamentos localizados, que são conhecidos individualmente como ligamentos, quando bem desenvolvidos. Tais ligamentos são algumas vezes denominados de intracapsulares, para distingui-los da maioria, em posição extra capsulares, eles correm externamente à cavidade, estando recobertos por uma membrana sinovial (HICKMAN,1964; BRINKER,1986; GETTY,1986; DYRCE, 1990).

As afecções que afetam as articulações são muitas e variadas. O diagnóstico acurado é essencial para o estabelecimento do prognóstico e merece abordagem terapêutica racional. O diagnóstico depende principalmente da habilidade do clínico na tomada da história clínica e na realização dos exames físicos. Os dados laboratoriais, a radiologia e outros testes de diagnósticos auxiliares são utilizados apenas em apoio ou refutação das conclusões do exame clínico completo. Na artrologia veterinária, o principal propósito do exame físico consiste na criação de lista de diagnósticos diferenciais para os sinais de apresentação e para classificação do problema de apresentação como inflamatório, degenerativo, neoplásico ou desconhecido.

A última categoria mencionada é importante porque as novas afecções e novas variantes de moléstias antigas estão ainda sendo descobertas. Numa percentagem pequena, mas significativa, de casos não podem se estabelecer o diagnóstico definitivo. Contudo, na maioria dos casos pode ser confeccionada uma lista de diagnósticos diferenciais após o exame inicial e o diagnóstico poderá ser confirmado por investigações subsequentes (PIERMATTEI, 1999).

Literalmente significa inflamação da articulação, mas o termo é utilizado num sentido mais amplo, para abranger uma série de entidades patológicas bem definidas. A artrite é classificada como artrite do tipo degenerativa e as artropatias inflamatórias, para ajudar o clínico no reconhecimento de sinais os quais poderá sugerir o prognóstico e o tratamento a ser adotado. A artrite do tipo degenerativa abrange a osteoartrite, artrite traumática, artrite hemofílica e artrite neuropática e a artrite do tipo inflamatória que pode ser infecciosa, de base imune ou induzida por cristais (BRINKER et al., 1986).

No exame clínico as informações básicas do paciente são importante prelúdio para a obtenção da história clínica, pois muitas afecções articulares têm predisposição para idade, raça, sexo e o uso do animal, e a queixa de apresentação que une todos os animais com afecção articular é a claudicação, mas devem ser registradas notas adicionais da opinião do dono acerca de quais os níveis envolvidos. A história de registros genealógicos e a saúde de qualquer dos irmãos da ninhada, informações sobre números de refeições por dia, escore corporal, enfermidades ocorridas anteriormente, tratamentos previamente administrado, alterações de comportamento, sem claudicação aparente, principalmente em gatos, a classificação da afecção como aguda ou crônica, a classificação da claudicação como intermitente, migratória ou aditiva e a presença de rigidez da articulação após o repouso, são dados relevantes (ETTINGER E FELDMAN, 2004; NELSON E COUTO, 2010).

As afecções inflamatórias articulares causadas por infecção ou fatores imunológicos não são raras na prática de animais de pequeno porte, porém elas ocorrem com pouca frequência. Estas condições são caracterizadas por inflamação da membrana sinovial com resultantes alterações no líquido sinovial. A claudicação e marcha prejudicada são os sinais observados com maior frequência. As infecções articulares normalmente são causadas por bactérias que penetram na articulação tanto por meio de feridas penetrantes ou pela corrente sanguínea. Felizmente, estes exemplos são raros, porém quando uma infecção ocorre, ela pode ser devastadora para a articulação. A gravidade da destruição articular depende do tipo de bactéria e da duração da infecção. Sinais de dor e claudicação são os achados consistentes. A articulação apresenta-se tumefeita, quente e macia à palpação. Caso o traumatismo nos tecidos moles seja extenso, os sinais anteriores podem estar presentes sem a infecção (PIERMATTEI, 1990).

Algumas vezes a história clínica e o exame físico permitem a obtenção do diagnóstico definitivo, mas frequentemente neste apenas será possível o estabelecimento de lista de diagnóstico diferencial, que serão excluídos através de exames complementares (ETTINGER E FELDMAN, 2004).

No diagnóstico, é conveniente realizar a análise do líquido sinovial e a coloração de Wright do exsudato centrifugado. Culturas e testes de sensibilidade são obrigatórios, apesar da cultura da biopsia sinovial ser melhor. As radiografias podem mostrar a distensão capsular, a lise subcondral pode aparecer mais tarde (PIERMATTEI, 1990).

Todas as suspeitas de afecções articulares em cães e gatos constituem-se numa indicação para radiografias, porém os achados radiográficos nem sempre são compatíveis com o quadro clínico apresentado pelo animal. A ultrassonografia, a cintilografia óssea são exames que possuem limitações quanto ao laudo da artrite, porém as técnicas da tomografia computadorizada fornecem imagens planares que podem propiciar maiores informações que as radiografias convencionais. As imagens obtidas por ressonância magnética fornecem o diagnóstico mais preciso, mas custo de tais equipamentos ainda é amplamente proibitivo. A análise do líquido sinovial é procedimento rotineiro na investigação da afecção articular, assim como a biopsia, artroscopia e a artrotomia sendo este último associado ao tratamento cirúrgico, quando houver indicação (ETTINGER E FELDMAN, 2004; NELSON E COUTO, 2010).

A doença articular degenerativa (DAD), ou osteoartrite, é um distúrbio progressivo crônico das articulações que provoca lesão da cartilagem articular e alterações degenerativas e proliferativas nos tecidos periarticulares. Instabilidade articular, trauma, doenças ortopédicas do desenvolvimento e a idade do animal são as causas mais comumente identificadas. Embora considerada não inflamatória com base na citologia do líquido sinovial, há o envolvimento dos mediadores inflamatórios nas manifestações clínicas e na progressão das DAD. Estima-se que aproximadamente 20% da população canina na América do Norte sejam acometidos por DAD em pelo menos uma articulação (NELSON E COUTO, 2010; BRINKER ET AL, 1986).

A inevitável progressão da osteoartrite pode ser atribuída em grande parte a degradação enzimática da cartilagem articular. O início da osteoartrite não está nitidamente esclarecido, mas há hipóteses que tensões anormais atuantes na cartilagem normal resultam em osteoartrite, ou a osteoartrite é consequência de tensões normais atuantes sobre a cartilagem anormal, embora também seja possível a ocorrência de tensões anormais, ou de cartilagem anormal (ETTINGERE FELDMAN, 2004).

A osteoartrite mais comumente se apresenta como claudicação com surgimento súbito, insidioso, com apresentação aguda associadas a episódios de traumatismo menores ou de exercício excessivo, superpostos a afecção preexistente (BRINKER ET AL, 1986).

Frequentemente o sinal clínico mais precoce observado pelo dono é a queda do desempenho normal, que se manifesta como relutância em saltar ou em subir escadas. A rigidez após o repouso, apenas por alguns minutos, é sinal fundamental da moléstia articular e está presente em casos de osteoartrite antes do surgimento da claudicação evidente (ETTINGERE FELDMAN, 2004).

Claudicação e rigidez podem ser inicialmente evidentes apenas após período de esforço excessivo podendo piorar com o frio e a umidade. Cães acometidos de forma leve podem apresentar melhora da claudicação com o exercício. À medida que a DAD progride, a fibrose e a dor levam à diminuição da tolerância ao exercício, claudicação constante e, em casos graves, atrofia muscular (NELSON E COUTO, 2010).

O diagnóstico da DAD é baseado no histórico, nos achados do exame físico e nos aspectos radiográficos observados. Animais com DAD frequentemente não apresentam febre, leucocitose ou prostração, comumente ocorrido em animais com doença articular inflamatória (HICKMAN, 1964). O líquido sinovial do animal com DAD pode estar com redução discreta da viscosidade, contagem de leucócitos normal ou levemente alterada, células mononucleares constituindo no mínimo 80% do total, e raros neutrófilos, porém lesões articulares agudas ou ruptura ligamentar ocasionalmente incitam uma resposta mais inflamatória, com aumentos

moderados no número de neutrófilos do líquido sinovial que persistem por semanas após a lesão (ETTINGERE FELDMAN, 2004).

O tratamento de cães acometidos por DAD é direcionado para o alívio do desconforto e prevenir degeneração adicional. A intervenção pode ser necessária para estabilizar a articulação ou corrigir uma deformidade e aliviar o desconforto. O tratamento médico é sintomático e inespecífico, sendo recomendada a redução do peso corporal do animal, o repouso e exercícios de baixo impacto como forma de fisioterapia, suplementação dietética com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes ou alimentação comercial de dietas articulares contendo suplementos para diminuir a inflamação e a dor da DAD (NELSON E COUTO, 2010; HICKMAN, 1964).

As drogas anti-inflamatórias não esteroides são recomendadas pelos seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, inibindo a síntese de prostaglandinas e a seleção das duas formas da ciclo-oxigenase, preferencialmente inibindo a COX-2 e relativa proteção da COX-1 (NELSON E COUTO, 2010).

O ácido hialurônico é um glicosaminoglicanos não sulfatado que pode ser administrado intra-articularmente para melhorar a viscosidade sinovial e diminuir a inflamação de forma preventiva após trauma ou submetidos a cirurgia sabidamente causadores de lesões a cartilagem articular, porém estudos ainda são necessários para avaliar a eficácia deste produto (ETTINGERE FELDMAN, 2004).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), e no Setor de Clínica Médica do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), ambos na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Sendo submetido ao Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) desta Universidade e aprovado sob a licença nº 046/2012.

As atividades previstas foram desenvolvidas em três etapas:

1. Obtenção das sementes de sucupira diretamente de cultivo comercial sediado na região metropolitana do Grande Recife-PE. Preparação dos extratos da semente e caracterização fitoquímica.
2. Realização dos bioensaios de atividade espontânea e testes de toxicidade aguda.
3. Realização dos bioensaios em modelos para avaliação da atividade antiinflamatória, analgésica e de recuperação física em modelo de incapacitação articular, bem como avaliação macroscópica de órgãos e tecidos dos animais sob bioensaios.

### 4.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*, albinos suíço) machos, com massa corpórea entre 30 e 35 gramas provenientes do biotério do Laboratório Nacional Agropecuário LANAGRO-PE, do Ministério da Agricultura. Estes animais, após um período de adaptação de 30 dias, foram mantidos em gaiolas apropriadas, em numero de oito animais por gaiola, recebendo água “*ad libitum*” e alimentação livre de suplementação com antibióticos, permanecendo sob condições de temperatura de 25 C e luminosidade com ciclo de luz 12x12h na relação claro/escuro.

## 4.2. Drogas

Todas as substâncias utilizadas neste trabalho, inclusive os solventes, foram de grau analítico, obtidas de fabricantes como Sigma Inc. e da Reagen, S.A.

A Dexametazona e o Celecoxibe (figura 4.1 e 4.2) foram obtidos a partir de distribuidores locais, inclusive o Cloridrato de Xilazina e o Cloridrato de Cetamina.



**Figura 4.1 – Celecoxib**

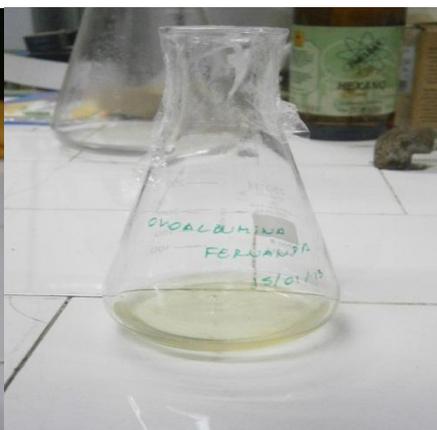


**Figura 4.2 - Dexametazona**

Todas as demais soluções foram preparadas nas dependências do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE (figura 4.3 e 4.4).



**Figura 4.3 – Extrato de Sucupira**



**Figura 4.4 - Ovalbumina**

### 4.3. Obtenção dos extratos da semente de Sucupira

Inicialmente, as sementes de sucupira (figura 4.5), após um processo de seleção e higienização prévia foram submetidas a um mecanismo de tração para a quebra das mesmas totalizando uma massa final de 50 g de sementes trituradas. Em seguida, este material foi depositado em um Erlenmeyer (figura 4.6) contendo 200mL de álcool etílico a 70%, onde após vedação e identificação (figura 4.7), foi colocado para maceração por um período de 14 dias à temperatura de 25 C. Após este período, o material foi devidamente filtrado em filtros de 14  $\mu\text{m}$ , permeabilidade de 20 mmCa – 14I/Sm<sup>2</sup>. Em seguida foram retirados 200 $\mu\text{L}$  da solução final, para a determinação da concentração da solução, obtendo-se um valor de 230mg/mL.



**Figura 4.5 - Semente de sucupira**



**Figura 4.6 – Sementes trituradas**



**Figura 4.7 – Extrato hidroalcoólico da semente de sucupira.**

Da solução de estoque acima, foram retirados 100mL acrescido de 100mL de diclorometano num funil de separação e deixados por 18h. Após este período foi separada a porção orgânica da amostra sendo adicionado sulfato de magnésio anidro para a remoção da água residual, sendo o conteúdo submetido novamente à filtração, agora se utilizando um filtro de 0,02  $\mu\text{m}$  para posterior armazenamento sob refrigeração, até o momento do uso, conforme recomendações em Ferri (1995). A concentração final desta preparação foi também determinada, obtendo-se um valor de 120mg/mL.

#### **4.4 Bioensaios de atividade espontânea e teste de Toxicidade**

Os testes de toxicidade e de avaliação clínica da atividade espontânea em camundongos foi efetuado tomando-se como referência os trabalhos de Malone, (1983), Lapa et al. (2002) e Almeida (2006).

Seis grupos com oito animais cada serão formados, sendo que em cada grupo os organismos recebeu, em dose única por via intraperitoneal (ip), um volume de 0,2mL da fração orgânica do extrato da semente de sucupira, onde após evaporação do solvente, o resíduo final era re-eluído em solução salina a 0,9%. As doses finais obtidas foram:

385,71mg/Kg; 1157,13mg/Kg; 2314,26mg/kg; 4628,58mg/Kg; 7714,30mg/Kg e 9257,10mg/Kg.

Após os animais receberem a droga, estes eram alocados em ambiente aberto, onde as respostas comportamentais espontâneas eram registradas por um período de 100 minutos de observação contínua. Após esta etapa, os animais eram recolhidos e guardados para observações episódicas em 24h, 48h, 72h e 168h.

Após a fase de experimentação, as principais respostas eram devidamente tabuladas e organizadas segundo os descritores disponíveis em Malone (1983), Lapa et al, (2002) e Almeida (2006). Deste tabulamento, obteve-se a dose de referência para a realização dos demais bioensaios, considerando-se a ocorrência de respostas clínicas desfavoráveis, conforme poderá ser visto nos resultados a seguir do presente trabalho.

A dose empregada da fração orgânica do extrato de sucupira, eluída em solução salina a 0,9%, em todos os animais dos grupos de tratamento com sucupira foi de 205,70 mg/Kg, num volume de 0,2mL i.p. por animal.

Ainda é importante assinalar que foi tomado como parâmetro de quantificação das respostas observadas o número de animais responsivos a cada intervalo de 10 min, até serem completados os 100 min de observação.

A relação dose/efeito foi dimensionada considerando-se o número médio de animais responsivos a cada dosagem empregada, no período completo de 100 min de observação, aferindo-se o coeficiente de correlação entre estes dois parâmetros, mediante emprego de planilha estatística do programa Excel da Microsoft versão Office 2007.

#### **4.5 Determinação do Potencial Anti-inflamatório**

Tomando-se como referência a metodologia descrita em Swingle e Shideman, (1972), dois grupos com oito animais cada foram separados e os animais, após processo anestesiológico prévio com cloridrato de cetamina (70mg/Kg ip. ) e Xilazina (14mg/Kg ip) recebiam implantes de um disco de algodão de 10mg (figura 4.8) no espaço subcutâneo na região dorsal do lado direito. Após um período de 24h os animais de um dos grupos recebiam

diariamente, uma dose de 205,70 mg/Kg ip. Após um período de sete dias os animais, de ambos os grupos, foram submetidos a um teste de ansiedade como proposto por Leite e Siqueira (2006).



**Figura 4.8 – Discos de algodão**

Este teste de ansiedade na verdade consistia em apresentar 10 esperas coloridas, de material não perecível e não tóxico, aos animais de uma determinada gaiola, por 10 minutos (figura 4.9). Após este período verificava-se o número de bolinhas cobertas pela maravalha, tomando-se isto como indicativo do nível de estresse e ansiedade dos animais do grupo.



**Figura 4.9 – teste de ansiedade.**

Após a realização do teste de ansiedade os animais foram eutanasiados mediante aprofundamento anestésico com cloridrato de xilazina (20 mg/Kg im) e cloridrato de cetamina (185mg/Kg im), conforme metodologia descrita em Hall (2001). Após a perda dos reflexos vitais, os animais sofriam incisão cirúrgica para remoção do tecido fibrovascular, que

em seguida era submetido à um procedimento de secagem a 37 °C por 24 horas. Após esta etapa o material era submetido à pesagem em balança analítica da Metler Inc. onde a massa do tecido fibrovascular era determinada pela diferença entre a massa inicial (10mg) e a massa final.

Os órgãos fígado e baço foram retirados para as devidas análises macroscópicas e pesagem.

#### **4.6. Bioensaios para a avaliação do potencial de recuperação da incapacitação articular induzida**

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do modelo de incapacitação articular neste trabalho foi conseguido tomando-se como referência os trabalhos de Vaz, et al. (1996) e Marinho et al. (2004). Trinta e seis animais receberam injeção intratecal de 1µl de solução salina de ovalbumina a 2,5% pH 7,4. Após um período de 24 horas, estes animais foram subdivididos em quatro grupos, sendo o primeiro controle, onde os animais somente recebiam a manipulação similar aos demais grupo, mas não recebiam tratamento. No segundo grupo os animais eram tratados diariamente com dexametazona numa dose equivalente a 5mM por animal (ip). No terceiro grupo os animais recebiam, diariamente, uma dose de 5mM por animal de celecoxib (ip). No quarto grupo os animais recebiam uma dose de 205,70 mg/Kg (ip) de solução salina com a fração orgânica do extrato da semente de sucupira.

Após um período de sete dias, os animais de todos os grupos foram submetidos inicialmente a um teste de analgesia em modelo de placa quente a 55 °C (figura 4.10), segundo metodologia descrita em Almeida e Oliveira (2006). Logo em seguida, os animais de todos os grupos eram submetidos a um teste de ansiedade (figura 4.9) segundo metodologia descrita em Leite e Siqueira (2006), conforme já assinalado acima. Ao final deste processo os animais eram então submetidos ao teste da barra vertical (figura 4.11), como sugere a metodologia descrita em Murphy et al. (1995).



**Figura 4.10- Teste de analgesia**



**Figura 4.11- Teste de incapacitação articular**

Este último teste consistia em submeter os animais de cada grupo à uma plataforma móvel, que permitia inclinação de até  $90^\circ$ . Como critério de avaliação considerava-se que animais com prejuízos da coordenação motora não conseguiria escalar uma plataforma com uma inclinação superior a  $45^\circ$ . Registrava-se, portanto, o tempo que os animais levavam para escalar tal plataforma com uma inclinação de  $46^\circ$ .

Após todos os bioensaios acima, os animais foram eutanasiados mediante aprofundamento anestésico com Cloridrato de xilazina (20mg/Kg ip) e Cloridrato de cetamina (185mg/Kg 1p), segundo Hall et al. (2001).

Após a perda do estado de consciência alíquotas de sangue eram obtidas por punção cardíaca, para posterior dosagem das transaminases TGO, TGP, fosfatase alcalina (FA), ureia e creatinina, em Laboratório especializado.

Os órgãos: Fígado, coração, rins direito e esquerdo, baço e pulmão foram retirados para avaliação macroscópica e pesagens.

#### **4.7 Análise Estatística**

Os resultados obtidos nos bioensaios foram expressos em termos de média e desvio padrão, e ocasionalmente em percentuais, sendo as diferenças avaliadas mediante testes estatísticos paramétrico disponíveis em planilha do pacote estatístico Graph Pad da Prism versão 3.0, considerando-se um nível descritivo de significância equivalente à um valor de  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Algumas considerações sobre o extrato da semente de sucupira**

A semente de sucupira branca, após trituração, foi preparada com solução de álcool etílico a 70%, onde, após a fase de maceração, permitiu a obtenção de um extrato bruto. Este extrato bruto foi submetido a um procedimento de extração mediado por diclorometano, que após um procedimento de separação, deu origem a duas preparações: uma hidrofílica e outra orgânica.

Bem, em atenção à expectativa popular sobre as propriedades terapêuticas do óleo essencial da semente de sucupira, neste trabalho os ensaios foram efetuados preferencialmente com a fração orgânica do extrato da semente de sucupira branca, embora não signifique dizer que a fração hidrofílica não tenha propriedades interessantes.

### **5.2 Atividade espontânea em camundongos estimulados com a fração orgânica do extrato da semente de sucupira branca – FOESSB**

Após a etapa de preparação dos extratos, iniciou-se um trabalho de realização de bioensaios de atividade espontânea, com a finalidade de se construir um mapeamento das principais respostas comportamentais de camundongos que receberam diferentes doses do FOESSB. Após a realização de cada ensaio, os dados foram organizados segundo os descritores sugeridos por Malone, (1983), Lapa, et al (2002) e Almeida (2006), na intenção de se encontrar uma forma mais completa possível de abarcar as respostas exibidas pelos animais neste tipo de estudo.

Na tabela 5.2.1 podem ser observados o total de efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central – SNC, como também os efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo – SNA além de outros efeitos não previstos no sistema de descritores dos autores acima assinalados, conforme as doses empregadas nos bioensaios de atividade espontânea. Bem, nesta tabela pode-se verificar que tanto a quantidade como a qualidade dos mesmos

variaram conforme a dose, embora em primeira vista as respostas estimulantes sobre o SNC parecem predominar na maioria das doses avaliadas.

Tabela 5.2.1 Efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central – SNC, Efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo – SNA e outros efeitos observados em camundongos sob atividade espontânea, que receberam em dose única diferentes doses de FOESSB.

<b>Efeitos</b>	<b>Doses (mg/Kg)</b>					
	<b>9257,10</b>	<b>7714,30</b>	<b>4628,58</b>	<b>2314,26</b>	<b>1157,13</b>	<b>385,71</b>
Estimulantes sobre o SNC	9	18	14	12	10	11
Depressores sobre o SNC	11	12	10	8	8	8
Que atuaram sobre o SNA	10	7	9	11	5	7
Outros	7	9	15	8	10	10
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>46</b>	<b>48</b>	<b>39</b>	<b>33</b>	<b>36</b>

**SNC – Sistema Nervoso Central; SNA – Sistema Nervoso Autônomo.**

Na tabela 5.2.2 podem ser observados em termos de percentual as respostas assinaladas na tabela 5.2.1. Nesta tabela pode-se verificar a predominância dos efeitos estimulantes sobre os demais na maioria das doses avaliadas.

Tabela 5.2.2 Percentual de efeitos estimulantes e depressores sobre o Sistema Nervoso Central – SNC, efeitos sobre o Sistema Nervoso Autônomo – SNA e outros efeitos observados em camundongos sob atividade espontânea, que receberam em dose única diferentes doses de FOESSB.

<b>Efeitos</b>	<b>Doses (mg/Kg)</b>					
	<b>9257,10</b>	<b>7714,30</b>	<b>4628,58</b>	<b>2314,26</b>	<b>1157,13</b>	<b>385,71</b>
Estimulantes sobre o SNC	24,32	39,13	29,17	30,77	30,30	30,56
Depressores sobre o SNC	29,73	26,09	20,83	20,51	24,24	22,22
Que atuaram sobre o SNA	27,03	15,22	18,75	28,21	15,15	19,44

Outros	18,92	19,57	31,25	20,51	30,30	27,78
<b>Total</b>	100	100	100	100	100	100

Na figura 5.2.1, pode-se verificar mais nitidamente que a medida em que se variava a dose da FOESSB obtinha-se uma expressão característica dos efeitos sobre o comportamento animal, podendo-se assinalar alguns aspectos. Primeiramente a predominância dos efeitos estimulantes sobre o SNC, aumentando-se esta predominância com doses acima de 6000 mg/Kg, embora com um certo limite em doses acima de 9000 mg/Kg. Um segundo aspecto é que a quantidade de respostas depressoras sobre o SNC aumentou com a dose. Em terceiro lugar, observou-se que os efeitos sobre o SNA foram maiores principalmente no intervalo compreendido entre as doses de 1000 mg/Kg e 4000 mg/Kg. E por fim que surgiram outros efeitos não previstos nos descritores tomados como referência, mas importantes o suficiente para serem registrados.

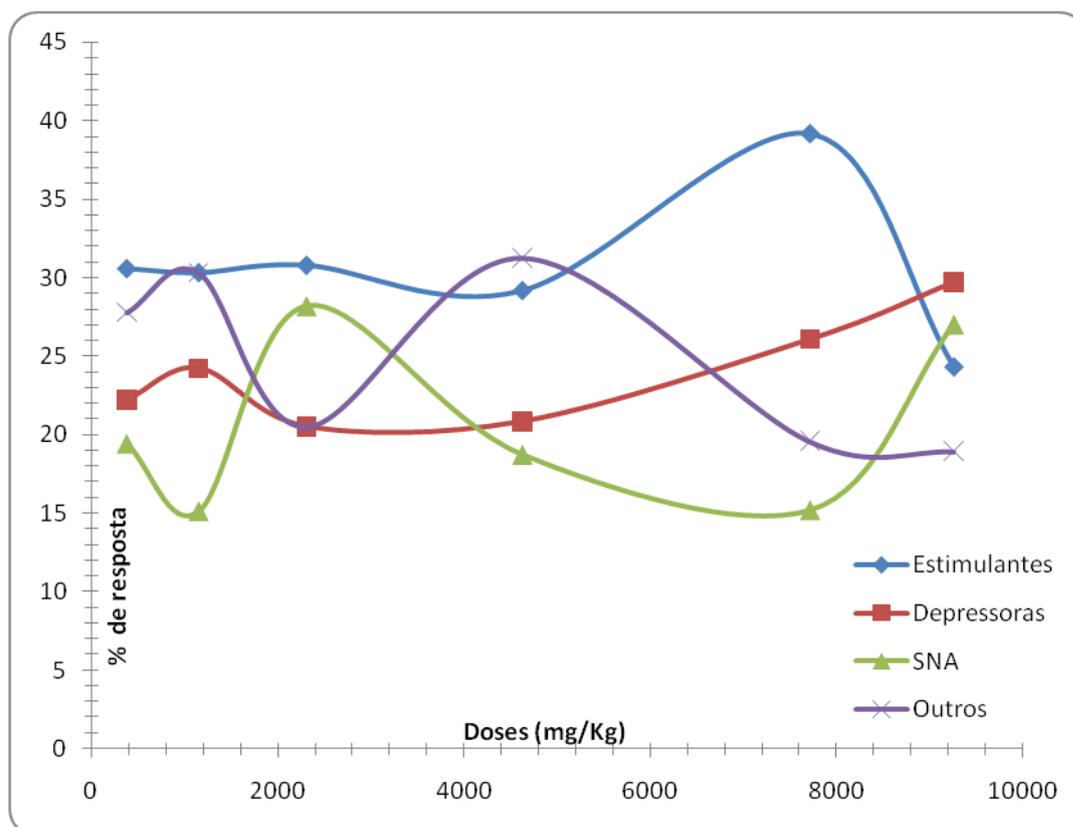


Figura 5.2.1 Trajetória do tipo de efeito, em termos percentuais, conforme a dose empregada da FOESSB.

Na tabela 5.2.3 podem ser visualizadas as principais respostas comportamentais classificadas como efeitos estimulantes sobre o SNC, de animais que receberam diferentes doses de FOESSB. Nesta tabela podem ser visualizados também o número médio de animais responsivos para um determinado comportamento considerando-se o intervalo de observação de 100 min nas diferentes doses. Também pode ser observado o coeficiente de correlação linear que estabelece uma relação de ocorrência entre o comportamento observado e a variação das dosagens nos bioensaios.

Aqui é interessante assinalar que uma correlação positiva com valor próximo de uma unidade equivale dizer que existe uma relação direta entre o aumento da dose e a ocorrência do comportamento. No caso de uma correlação negativa significa dizer que a relação entre o aumento da dose e a ocorrência do comportamento é inversa, ou seja, quanto maior a dose menor é a ocorrência deste comportamento observado.

Assim, pode-se observar que o número de animais responsivos por comportamento variou de forma característica conforme o tipo de estímulo aplicado, como também conforme o intervalo temporal considerado. Assim, verificou-se que alguns comportamentos foram muito mais expressivos do que outros, podendo-se agrupar entre os mais frequentes: Atividade exploratória, atividade olfatória espontânea, espasmos, movimento das vibriças, tremores na cabeça, cheirando o companheiro e contração abdominal

A atividade exploratória, pode estar associada ao desenvolvimento de estímulos no núcleo amigdalóide proporcionados por componentes ativos presente no extrato aplicado, fazendo com que o animal busque referenciais conhecidos para apaziguar o comportamento defensivo que normalmente pode vir conjugado (Almeida, 2006).

Já a atividade olfatória espontânea, neste caso específico, bem provavelmente parecia estar relacionada com uma diminuição da capacidade de percepção de estímulos químicos do ambiente, uma vez que o focinho dos animais avaliados normalmente exibiu um processo de edemaciamento que parecia perdurar até o fim dos 100 min. de observação. Nesta espécie de animal o bulbo olfatório é bem desenvolvido, sendo que estes organismos normalmente apresentam um elenco considerável de sinais químicos reconhecíveis a partir do ambiente. Assim, este tipo de resposta sensorial teria um impacto importante na vida destes organismos, uma vez que quase todas as operações destes organismos envolvem a participação do olfato, considerando-se portanto desde o reconhecimento dos seus parceiros

de grupo até a presença de sinais químicos específicos dos principais alimentos de sua dieta ou mesmo de seus eventuais predadores. O comportamento de cheirar o companheiro de grupo corrobora com este tipo de análise. Bem, seja como for, o FOESSB parece afetar as respostas vasculares nas imediações do focinho alterando a homodinâmica no local, afetando por sua vez o metabolismo dos tecidos locais.

Como já foi dito acima, alguns pesquisadores identificaram alguns compostos químicos em espécimes do gênero *Pterodon*, como alcalóides (TORRENEGRA et al., 1989), isoflavonas, diterpenos e triterpenos (FASCIO et al., 1975; MARQUES et al., 1998, ARRIAGA et al., 2000). Já nas sementes Braz Filho e Gottlieb (1971) identificaram nas sementes algumas isoflavonas. É possível que algumas destas substâncias tenham um papel importante na modulação de respostas vasculares, direta ou indiretamente mediante a participação de células residentes como mastócitos ou macrófagos. Estes tipos celulares, no processo de reconhecimento de informações antigênicas importantes, tem como característica promover ajustes na fisiologia do sistema circulatório ou mesmo do metabolismo animal, condicionando-o a estar preparado para reagir imunologicamente à presença de substâncias que apresentam-se potencialmente capazes de promover estímulos em certos compartimentos endógenos (ADAMS, 2003).

A ocorrência de espasmos e contrações abdominais denunciam a presença na FOESSB de substâncias com características de um ácido, irritante, que podem estimular diretamente os nociceptores em áreas adjacentes ao peritônio (ALMEIDA, 2006). Esta resposta esteve presente em alguns intervalos temporais durante as sessões de observação da atividade espontânea dos animais estudados.

Um outro tipo de resposta importante foi a ocorrência de tremores na cabeça, uma vez que estas respostas parecem estar relacionadas com estímulos que mimetizam a ação de agonistas serotoninérgicos em áreas importantes do SNC, como nos gânglios próximos da base cerebelar. Geralmente este tipo de estímulo pode gerar excitabilidade excessiva (SILVA, 2006). Neste aspecto é interessante destacar a ocorrência dos movimentos das vibriças em alguns animais que receberam FOESSB em diferentes momentos, que normalmente tendem a anteceder crises convulsivas (ARANDAS e SENA, 2006).

Um outro aspecto importante a ser assinalado é que muitas respostas comportamentais observadas na categoria dos efeitos estimulantes do SNC apresentaram coeficientes de

correlação linear importantes, denunciando a ocorrência de uma relação do tipo dose/efeito, ou seja efeitos que aumentam ou diminuem com o aumento da dose. Ainda nesta tabela 5.2.3 podem ser identificados entre os comportamentos com correlação positiva: Contração abdominal, movimento das vibríças, tremores na cabeça, andar aos saltos e cheirando o companheiro. Destes comportamentos o andar aos saltos parece relacionar-se a respostas a partir de substâncias que atuam sobre diferentes componentes do SNC promovendo excitabilidade excessiva. Agonistas e inibidores de recaptção neuronal ou extraneuronal do sistema noradrenérgico podem proporcionar este tipo de resposta (RANG et al., 1997). Assim como inibidores colinérgicos, agonistas glutamatérgicos também podem protagonizar ações estimulantes nos organismos afetados (SILVA, 2006), o que de certa forma evidencia a complexidade inerente ao estudo dos efeitos excitatórios nos organismos estudados. Sómente modelos mais pormenorizados possam oferecer subsídios para que se possa verificar com maior propriedade os verdadeiros responsáveis por esse tipo de efeito nos camundongos estimulados com a FOESSB.

Os tremores e as demais respostas observadas já foram assinaladas acima, embora deva-se ressaltar que estes efeitos são dose dependente.

Na mesma tabela 5.2.3, os comportamentos observados com coeficiente de correlação elevado, mas negativo tem-se: Atividade exploratória, atividade olfatória espontânea e a ação de coçar o companheiro de grupo. Estas respostas diminuem com o aumento da dose da FOESSB. Um comportamento ainda não discutido foi a atitude de coçar o companheiro de grupo, que em princípio parece estar relacionados a estímulos excitatórios intensos em áreas que controlam atividades sensoriais como o tato, ou mesmo afetividade, se considerarmos que a troca de estímulos táteis aguçam os laços de interatividade no grupo em especial as atividades cooperativas. Em princípio poderia-se esperar este tipo de comportamento com maior frequência em animais em atividade de corte, uma vez que as áreas neurológicas que controlam esta atividade poderiam, de alguma forma estarem estimuladas por substâncias advindas do extrato aplicado.

Também é possível de se admitir efeitos excitatórios parecidos com drogas que mimetizam a ação de substâncias excitatórias como um derivado de anfetamina, o metilenodioximetanfetamina (MDMA), que é um inibidor seletivo do armazenamento da serotonina e ligante do receptor 5HT serotoninérgico popularmente conhecido como ecstasy (NADAL-VICENS, CHYUNG e TURNER, 2009).

Tabela 5.2.3 Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos estimulantes sobre o SNC. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.

<b>Comportamentos</b>	<b>Número medio de animais responsivos em todas as doses</b>	<b>Coefficiente de correlação linear</b>
Atividade exploratória	2,0±2,1	-0,743
Escalonamento	0,2±0,3	0,275
Tremores na cabeça	0,7±0,4	0,542
Tremores generalizados	0,1±0,1	0,337
Tremores no Membro Anterior	0,1±0,1	-0,370
Serpenteando a cabeça	0,1±0,2	0,362
Contração abdominal	0,6±0,8	0,539
Espasmo	0,9±1,1	0,309
Agitação	0,5±0,6	0,226
Movimento das vibríças	0,9±1,0	0,926
Saltos isolados	0,1±0,2	0,382
Andar aos saltos	0,2±0,3	0,914
Convulsão	0,02±0,04	0,470
Andando em círculos	0,03±0,08	0,470
Atividade olfatória espontânea	1,6±0,963328	-0,886
Cheirando os testículos	0,05±0,08	-0,178
Cheirando a superfície da gaiola	0,1±0,1	0,165
Cheirando a própria	0,1±0,2	-0,405

cauda		
Cheirando o companheiro	0,7±0,4	0,755
Apoiado no trem posterior	0,4±0,4	-0,115
Comportamento agonista	0,02±0,04	0,052
Vocalização	0,1±0,2	-0,261
Coçando o companheiro	0,02±0,04	-0,522

---

Na tabela 5.2.4 podem ser identificados as principais respostas comportamentais classificadas como efeitos depressores sobre o SNC, de animais que receberam diferentes doses de FOESSB. Nesta tabela podem ser visualizados também o número médio de animais responsivos para um determinado comportamento considerando-se o intervalo de observação de 100 min nas diferentes doses, como também pode ser observado o coeficiente de correlação linear que estabelece uma relação de ocorrência entre o comportamento observado e a variação das dosagens empregadas nos bioensaios.

Os efeitos depressores mais frequentes foram: cauda em Straub, sedação, ptoses 0 e 1, analgesia ao pinçamento de cauda e aglomerados.

A cauda em Straub geralmente esta associada à ocorrência de fortes espasmos na musculatura da base da cauda e em torno do anus, uma das características de substâncias que atuam como opióides ou agonistas serotoninérgicos (LAPA et al, 2002; ALMEIDA, 2006). Já a sedação, especificamente neste trabalho, pode estar relacionada ao horário em que os experimentos foram realizados; uma vez que os camundongos são animais de hábitos noturnos e à tarde os efeitos depressores que tendem a diminuir o estado de vigília tendem a ser mais proeminentes. Assim, quando os componentes químicos presentes no extrato atuam de maneira a não sobrepujar os efeitos espontâneos de sedação, então o animal tende a manifestar o comportamento padrão da espécie para o repouso do organismo. A ptose e o aglomeramento observado em diferentes intervalos parecem corroborar para a mesma situação aqui discutida.

Mas, a resposta analgésica ao pinçamento de cauda proporcionada pela presença de substâncias da FOESSB merece atenção especial. Em primeiro lugar, este efeito analgésico não parece ter sido proporcionado por ações via gabaérgica, uma vez que os animais que manifestavam tal comportamento não necessariamente estavam sedados ou em hipnose. Este efeito analgésico também não parece ser proporcionado por mediadores relacionados à cascata do ácido araquidônico, uma vez que não havia um processo inflamatório instalado previamente. Bem, é possível que o efeito analgésico observado esteja relacionado com a manifestação de transformações nas vias nociceptivas onde atuam os opióides endógenos. Uma evidência indireta disto seria a ocorrência da cauda em Straub observada em alguns animais que receberam FOESSB; resposta esta também possivelmente relacionada à presença de opióides.

Quanto a correlação positiva destacaram-se os comportamentos: Cauda em Straub, sedação, abdução das patas do trem posterior e pavilhão auricular em repouso; sendo estes efeitos aumentados com o aumento da dose.

A abdução do trem posterior parece relacionar-se com um estado de hipotonia na musculatura do trem posterior, onde observa-se flacidez nos músculos denominados de antigravitacionais, denunciando prejuízo importante nos núcleos reticulares pontinos, localizados no tronco cerebral (ALMEIDA, 2006).

Já com relação ao pavilhão auricular em repouso, este comportamento parece estar associado ao fato de que os bioensaios foram realizados no período da tarde, onde normalmente estes animais deveriam estar em repouso absoluto, uma vez que estes organismos possuem hábitos noturnos. Ou seja, na ausência de estímulos químicos que desafiem os mecanismos associados ao controle dos mecanismos que regulam a relação sono/vigília, devem predominar os efeitos decorrentes da programação fisiológica “normal” destes organismos para adaptá-los às condições ambientais apresentadas.

Não foram observados efeitos depressores sobre o SNC importantes, que assinalem uma correlação negativa entre a intensidade de efeito e o aumento da dose.

Tabela 5.2.4 Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos depressores sobre o SNC. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.

<b>Comportamentos</b>	<b>Número medio de animais responsivos</b>	<b>Coefficiente de correlação linear</b>
Cauda em Straub	1,0±0,8	0,521
Cauda "S"	0,7±0,4	0,043
Sedação	2,0±2,6	0,772
Ptose 1	2,3±0,6	-0,490
Ptose 0	2,0±0,9	-0,301
Abdução das patas do trem posterior	0,2±0,3	0,918
Pavilhão auricular em repouso	0,02±0,04	0,679
Andar apoiado no trem posterior	0,3±0,7	-0,489
Analgesia ao pinçamento de cauda	5,1±2,5	-0,303
Inércia “em pé”	0,6±1,2	-0,360
Isolamento	0,1±0,1	0,303
Parada respiratória	0,02±0,04	0,470
Aglomerados	1,8±2,5	-0,266
Diminuição da ambulação	0,02±0,04	0,052

Já na tabela 5.2.5 estão registrados comportamentos que denunciam efeitos sobre o SNA protagonizados pela presença de substâncias ativas presentes na FOESSB. Entre as respostas mais bem representadas destacam-se: Edema de focinho, hiperemia dos coxins posteriores, cianose no focinho, hiptermia na cauda congestão auricular e taquipneia.

O edema de focinho esta associado a transformações importantes no leito vascular local, como já assinalado anteriormente, bem provavelmente devido à participação de células residentes como macrófagos e mastócitos. As alterações circulatórias locais podem ter

modificado o fluxo sanguíneo local, dificultando as trocas gasosas, caracterizando o quadro cianótico local (ADAMS, 2003). Por outro lado, as outras respostas parecem, de certa forma, relacionar-se com alterações no fluxo sanguíneo sistêmico, gerando um quadro hipertensivo, que por sua vez afetaria os padrões de ritmicidade circulatória, principalmente o sincronismo fisiológico entre a resposta circulatória e a hematose ao nível dos alvéolos pulmonares. O aumento da pressão arterial, se persistente, faz com que a hematose não ocorra de forma completa e plena, faltando oxigênio em diferentes áreas teciduais do organismo.

Uma outra possibilidade para estas últimas transformações circulatórias observadas poderia associar-se à presença na FOESSB de substâncias que inibissem o sistema colinérgico, tendo como consequência um aumento das respostas noradrenérgicas em diferentes sistemas, em especial sobre algumas porções do leito vascular (RANG et al., 1997; SILVA, 2006).

Quanto a relação dose efeito, verificou-se que apresentaram correlação positiva respostas: Olfacção aumentada, hiperemia nos testículos incontinência urinária e cauda hiperêmica. Considerando-se que as respostas de hiperemia nos testículos bem como na cauda possam estar relacionadas com o mesmo fator desencadeador, pode-se dizer que o aumento das doses promovem aumento da pressão arterial nestas estruturas. De certa forma os outros dois comportamentos poderiam estar também relacionados, se considerarmos que um aumento da pressão arterial significaria um aumento da pressão de filtração renal, com maior probabilidade de eliminação de fluidos. Se pensássemos no tecido pulmonar, uma ação hipertensiva ao nível alveolar, poderia provocar problemas locais de hemodinâmica, dificultando a hematose local.

Com relação aos eventos de correlação negativa destacam-se a cauda cianótica e a congestão auricular. Com o aumento das doses da FOESSB estes eventos parecem ocorrer com menor frequência, provavelmente em decorrência de transformações circulatorias locais em virtude do reconhecimento de substâncias antigênicas provenientes do extrato aplicado, envolvendo a participação de células residentes como macrófagos e mastócitos nestes tecidos, modulando as respostas vasculares.

Bem, de tudo isto, verifica-se até aqui, que a FOESSB apresenta na sua composição substâncias que tem impactos importantes sobre a dinâmica vascular, afetando direta ou indiretamente os mecanismos de regulação circulatória dos organismos afetados.

Estudos mais específicos em modelos mais apropriados poderiam elucidar melhor estas respostas e revelar detalhes importantes sobre as reais possibilidades de interação das substâncias presentes na FOESSB.

Tabela 5.2.5 Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam efeitos sobre o SNA. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito em animais que receberam a FOESSB.

<b>Comportamentos</b>	<b>Número medio de animais responsivos</b>	<b>Coefficiente de correlação linear</b>
Cauda cianótica	0,9±2,3	-0,522
Congestão auricular	4,1±3,6	-0,648
Olfacção aumentada	0,2±0,5	0,679
Dispneia	0,07±0,16	0,052
Taquipneia	1,0±0,7	0,023
Edema de focinho	6,7±1,8	-0,167
Hiperemia nos testículos	0,5±1,2	0,651
Hiperemia dos coxins posteriores	6,3±2,5	-0,339
Incontinência urinária	0,03±0,08	0,679
Cauda hiperêmica	0,1±0,2	0,640
Hipotermia na cauda	3,3±3,7	0,499
Caminhando com cauda paralela	0,9±0,4	0,102
Fezes com muco	0,03±0,05	0,413
Cianose no focinho	3,9±4,3	0,196
Piloereção	0,02±0,04	-0,261

Na tabela 5.2.6 podem ser visualizados outros comportamentos assinalados em animais que receberam diferentes doses da FOESSB, sendo que a proeminência testicular e os

diferentes tipos de manifestação de prurido foram as mais importantes ocorrências. A proeminência testicular pode estar relacionada com a presença de um estado hipotônico no sistema muscular que controla o movimento dos testículos neste tipo de organismo. A proximidade com os tecidos que margeiam a abertura do reto, pode sugerir que esta ação de proeminência testicular esteja relacionada com os mesmos efeitos que promovem a cauda em Straub, lembrando que substâncias que atuem como opioides ou agonistas serotoninérgicos podem promover este tipo de resposta.

Quanto ao prurido, é interessante assinalar que trata-se de uma resposta associada a mudanças nos padrões de condução de estímulos nas vias nociceptivas; o prurido associa-se à uma resposta de dor, protagonizada por neurônios que liberam como neurotransmissor substância P (GOLAN et al., 2009).

Em termos de correlação positiva, é importante assinalar a ocorrência das respostas de solução e apoio à superfície com a região ventral diretamente postada, sendo ambos os efeitos potencializados com o aumento da dose da FOESSB.

Os soluções podem estar relacionados com a perda de controle temporário do sincronismo entre os movimentos diafragmáticos do animal e o ritmo da dinâmica circulatória nos grandes vasos. As alterações de pressão arterial assinaladas acima, de forma repentina, dificulta a manutenção de um ritmo circulatório apropriado para o atendimento das demandas de oxigênio para as regiões mais afastadas do centro circulatório do animal. Enquanto que a postura apoiada com a superfície ventral exibida pelos animais afetados pode estar relacionada com o surgimento de estados de hipotensão postural, afetando o sistema de equilíbrio, pelas razões já assinaladas acima.

Com relação aos efeitos do tipo dose/efeito de correlação negativa, destacaram-se os de prurido na cauda e nos membros anteriores. Acreditando-se que estes eventos possam estar relacionados a um mesmo fator desencadeante, verificou-se que o aumento das doses da FOESSB parecem minimizar as respostas de prurido nessas estruturas, provavelmente por alterações na dimensão de células nervosas liberadoras de substância P, envolvidas na transdução de sinais relacionados à percepção da dor.

Seja como for, não foi possível determinar a  $DL_{50}$  como se tinha a intenção no início dos bioensaios uma vez que praticamente não ocorreram óbitos intermitentes até a dose de 9257,10 mg/Kg. Apesar disto, não significa que a FOESSB possa ser empregada

inadvertidamente em qualquer tipo de ensaio um em aplicações terapêuticas, sem que se observe alguns cuidados, principalmente com relação às relações do tipo dose/efeito observadas. Ou seja, dependendo da dose empregada nos protocolos devidos, é possível de se verificar respostas biológicas potencializadas em dimensões talvez não interessante para a preservação das condições de bem estar animal.

Tabela 5.2.6 Ocorrência de respostas comportamentais que assinalam outros efeitos em animais que receberam a FOESSB. Coeficientes de correlação linear que assinalam possíveis relações do tipo dose efeito.

<b>Comportamentos</b>	<b>Número medio de animais responsivos</b>	<b>Coefficiente de correlação linear</b>
Prurido no flanco Esquerdo	0,02±0,04	-0,261
Prurido na cauda	0,07±0,08	-0,705
Prurido nos coxins posteriores direito	0,03±0,05	-0,289
Prurido nos membros posteriores	0,3±0,4	-0,472
Prurido no abdome	0,5±0,5	-
Prurido no focinho	0,2±0,2	-1,7E-06
Prurido nos membros anteriores/focinho	0,5±0,3	0,166
Prurido no pavilhão auricular	0,3±0,1	-0,449
Prurido generalizado	0,1±0,3	-0,433
Prurido no membro anterior	0,9±0,7	-0,575
Prurido nos testículos	0,4±0,4	-0,479
Prurido no abdome	0,3±0,5	0,347
Soluço	0,1±0,1	0,910
Apoiado com a barriga	0,2±0,4	0,679
Óbito	1	0,470
Testículos	4,9±3,6	-0,285

proeminentes		
Cauda retorcida	0,02±0,04	0,470
Lambendo a superfície da gaiola	0,02±0,04	0,052
Pavilhão auricular defletido	0,1±0,2	-0,416
Carregando as fezes	0,02±0,04	0,052
Mordendo a própria cauda	0,02±0,04	0,052

---

Assim, estes resultados até aqui revelados assinalam que as doses recomendadas para estudo e outras aplicações devem ser inferiores a 385,71 mg/Kg; podendo este valor ser alterado na medida em que outras informações sejam acrescentadas, principalmente no tocante às avaliações histopatológicas complementares, não disponíveis neste estudo, mas já providenciadas e encaminhadas para novas e futuras abordagens sobre o mesmo tema.

### **5.3. Atividade Anti-inflamatória**

A atividade antinflamatória foi avaliada mediante o desenvolvimento da metodologia proposta por Swingle e Shideman (1972), como já foi apresentado no capítulo concernente à metodologia. Na tabela 5.3.1 podem ser identificados os valores da pesagem dos discos de algodão implantados nos animais após a secagem. Verificou-se portanto que o peso médio dos discos procedentes dos animais tratados com a FOESSB na dose de 205,70 mg/Kg era menor do que os discos provenientes dos animais do grupo controle, diferença esta significativa para um valor de  $p < 0,05$ .

Uma relação também procurou-se estabelecer entre as pesagens do fígado e do baço dos animais de ambos os grupos, construindo-se a tabela 5.3.2, que mostra os valores relativos concernentes aos órgãos dos animais tanto do grupo controle como do grupo tratado. Com estes dados foi possível efetuar uma comparação entre estas estruturas de ambos os grupos, verificando não ter havido diferença significativa entre as pesagens para um valor de  $p < 0,05$ .

Na figura 5.3.1 tem-se ilustrada graficamente a diferença encontrada entre as pesagens dos discos provenientes de animais tratados e do grupo controle, confirmando que a FOESSB tem ação anti-inflamatória, inibindo a deposição de material fibroso sobre os discos e neovascularização.

Bem, outros pesquisadores já haviam assinalado que semente das espécies do gênero *Pterodonsp*, podia inibir processo inflamatório (SABINO et al., 1996; NUNAN et al., 2001; COELHO et al., 2004). Mas estes ensaios ratificam que a FOESSB também pode inibir o processo inflamatório sendo que os animais não exibiram diferenças importantes quando submetidos ao teste de ansiedade, comparados com animais que não haviam recebido implantes, conforme mostram os dados da tabela 5.3.3 e figura 5.3.2. Este teste evidencia enfim a não ocorrência de resíduos comportamentais decorrentes de agravamentos físicos como incapacitações ou mesmo alterações de comportamento decorrentes da presença de dor ou ansiedade devido ao modelo experimental de resposta inflamatória implantado. Verificou-se portanto que em relação ao grupo controle não ocorreu diferença alguma, ao fim do tratamento.

Tabela 5.3.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória. Peso do fígado e do baço, além do peso do disco de algodão hidrófilo implantado subcutâneamente (10mg), avaliado 7 dias após o tratamento.

Grupos	Peso (g)			
	Fígado	Baço	Disco	Corpo
<b>Controle</b>				
Media	1,960	0,204	0,268	43,060
Desvio	0,326	0,042	0,092	4,957
CV	16,61	20,68	34,43	11,51
<b>Tratado</b>				
Media	1,762	0,209	0,169*	41,660
Desvio	0,173	0,051	0,069	4,975
CV	9,81	24,17	40,45	11,94

- Valor calculado  $t = 23,55481$ , diferença significativa para  $p < 0,05$  ( $gl = 18$ ).

Tabela 5.3.2. Razão de massas (g/g de peso corpóreo) para o fígado e o baço dos grupos tratados e controle provenientes dos bioensaios de atividade anti-inflamatória.

<b>Peso relativo</b>		
<b>(g/g de peso do corpo)</b>		
Tratamentos	Fígado	Baço
Controle	0,0455	0,0047
Sucupira	0,0423	0,0050

Não ocorreu diferença significativa para um valor de  $p < 0,05$ .

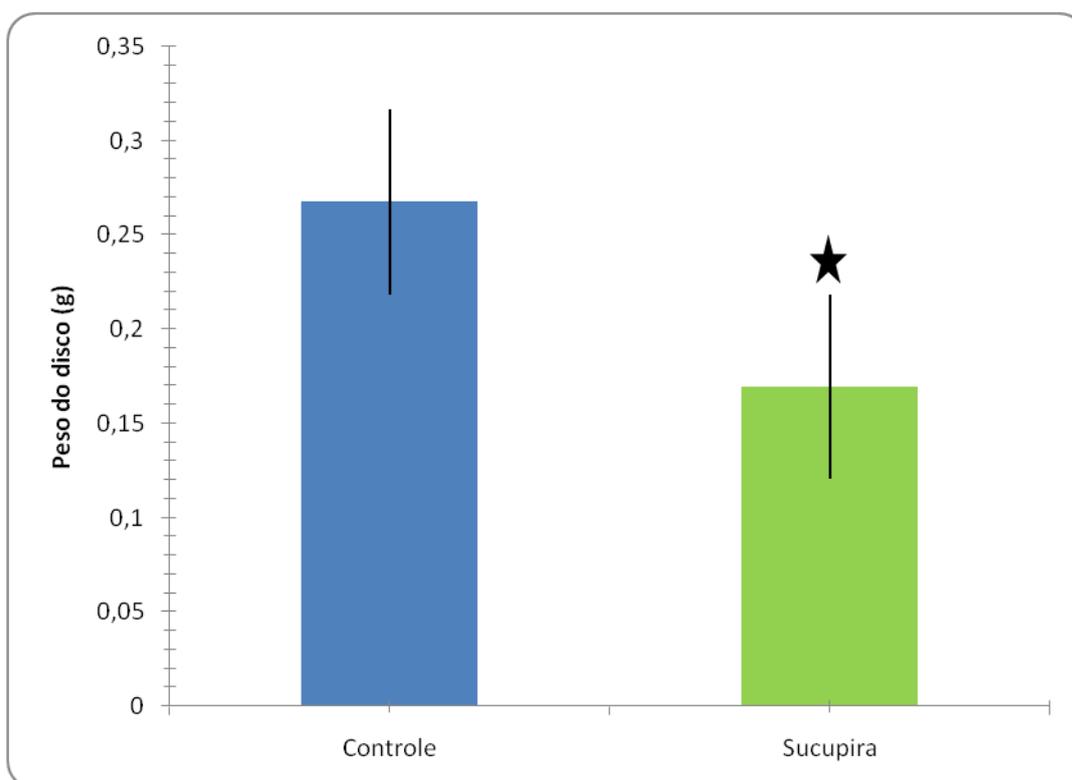


Figura 5.3.1 Comparação do peso dos discos de algodão implantados nos animais dos grupos controle e tratado com a FOESSB nos bioensaios para avaliação da atividade anti-inflamatória. \* Diferença significativa para um valor de  $p < 0,05$  quando da aplicação do teste estatístico t de Student para comparação dos valores médios e respectivos desvios.

Tabela 5.3.3. Número de bolinhas cobertas por maravalha das gaiolas de ambos os grupos de animais tratados com a FOESSB e animais do grupo controle.

Parâmetros	Controle	Sucupira
Frequência	3	3
Desvio padrão	0,3	0,3
	0,145	0,145

Não ocorreram diferenças significativas para um valor de  $p < 0,05$  (gl=18).

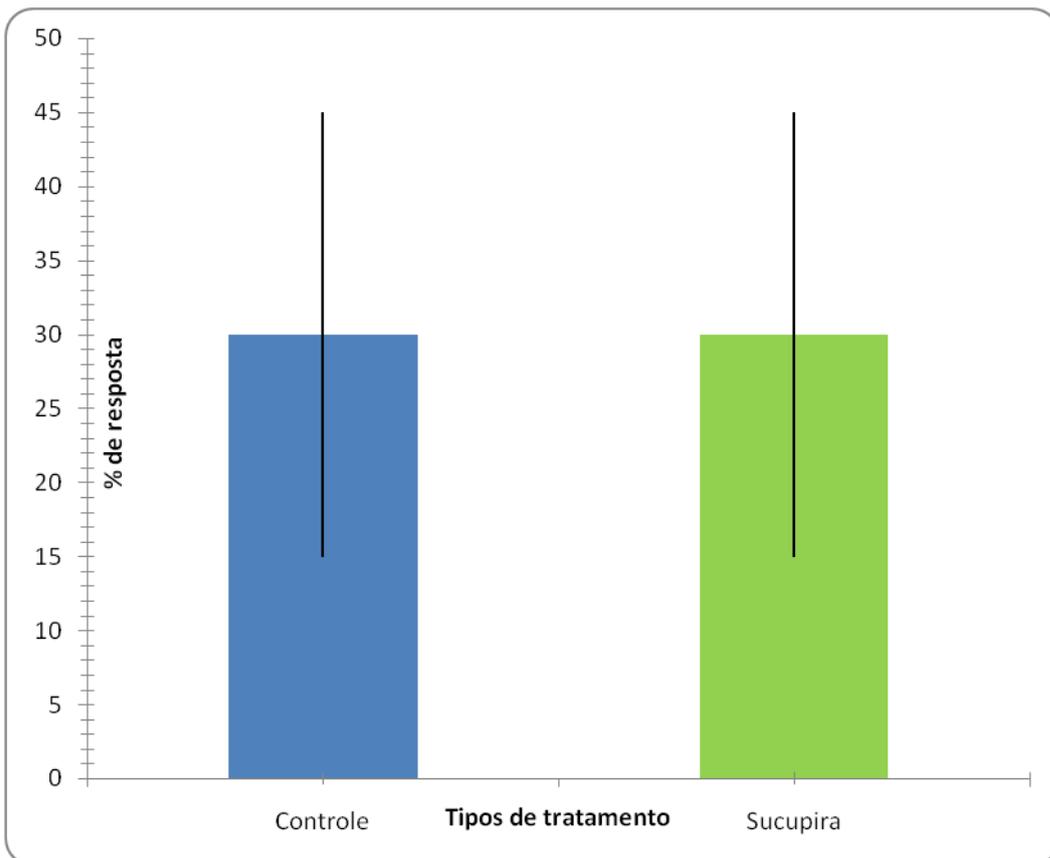


Figura 5.3.2. Percentagem de resposta positiva em animais dos grupos tratados com FOESSB e controle frente ao teste de ansiedade.

#### **5.4 Bioensaios para avaliação do potencial de recuperação em modelos de incapacitação articular induzida por Ovalbumina**

As dificuldades de realização de protocolos experimentais que ao mesmo tempo sejam simples em sua proposição de montagem e realização, como também de proporcionar resultados facilmente interpretáveis, levou ao desenvolvimento deste protocolo, já descrito em detalhes na metodologia. Após os animais terem completado o ciclo de indução da incapacitação articular como também dos tratamentos sugeridos, procurou-se avaliar inicialmente o nível de estresse destes animais, antes de submetê-los às etapas subsequentes. Na tabela 5.4.1 e figura 5.4.1, temos os principais resultados obtidos do teste de ansiedade, sinalizando a não ocorrência significativa entre os grupos avaliados para um valor de  $p < 0,05$ .

Uma vez não afetados os animais por problemas de estresse, conforme sugeria os dados do teste de ansiedade aplicado, numa próxima etapa estes mesmos organismos foram submetidos ao teste de analgesia mediado por placa quente a 55 °C. É interessante assinalar que o tempo de permanência dos animais na placa quente não favorece o desenvolvimento de lesões na superfície plantar dos seus membros posteriores e anteriores, pois considera-se como lastro temporal um tempo máximo de 30s para a observação da resposta característica que é a lambedura das patinhas quando os receptores térmicos destas extremidades são estimulados acima do limiar crítico de excitabilidade.

**Tabela 5.4.1** Resposta após o 7º dia de tratamento dos animais com incapacitação articular induzida por Ovalbumina ao teste de ansiedade. Grupos controle, Grupo com animais tratados diariamente com dexametazona (5mM ip), Grupo com animais tratados com Celecoxib (5mM ip) e grupo com os animais tratados com a FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg, n = 9 em cada grupo.

Parâmetros	Controle	Dexametazona	Celecoxib	Sucupira
Freq.	3	5	2	2
Desvio padrão	0,3	0,5	0,2	0,2
	0,145	0,158	0,127	0,127

Não ocorreram diferenças significativas para um valor de  $p < 0,05$  (gl=18).

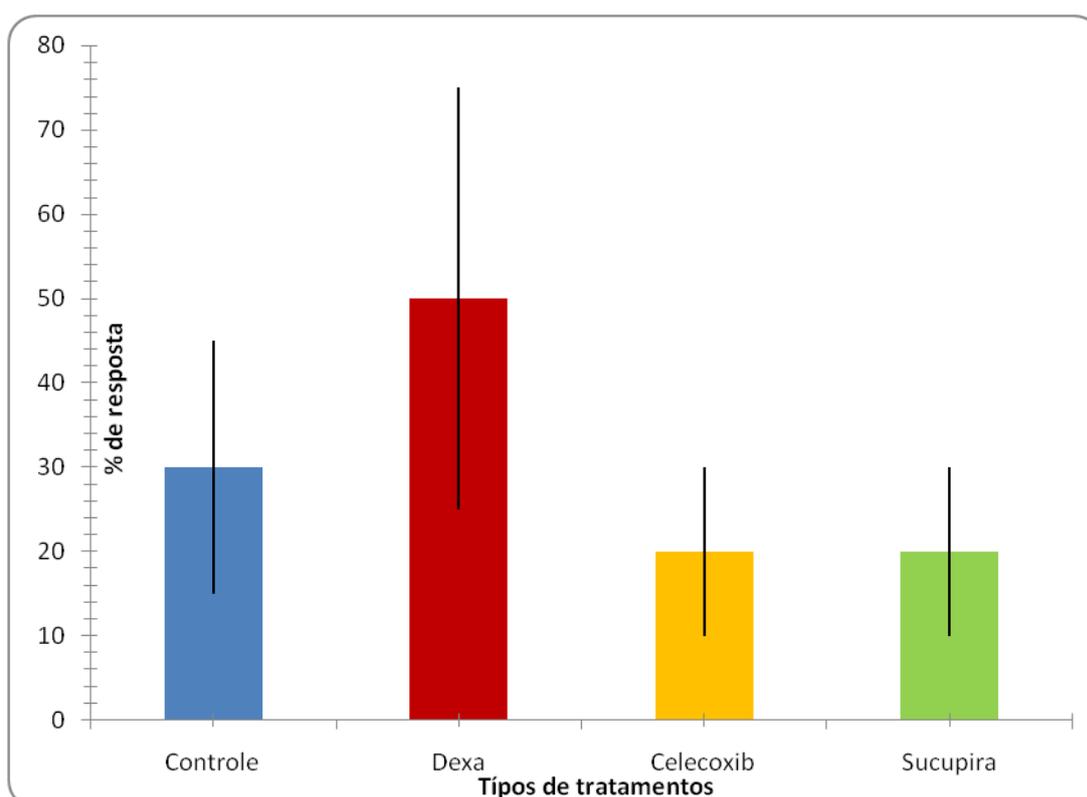


Figura 5.4.1 Percentual de resposta em teste de ansiedade dos animais com incapacitação articular submetidos à diferentes condições de tratamento. Diferenças não significativas para um valor de  $p < 0,05$ .

Na tabela 5.4.2 podem ser visualizados os tempos de resposta dos animais de cada grupo experimental avaliado quanto ao teste de analgesia por placa quente a  $55^{\circ}\text{C}$ , verificando-se que o tempo médio dos animais tratados com Celecoxib e com a FOESSB foram diferentes significativamente em relação ao grupo controle para um valor de  $p < 0,05$ . Esta diferença pode ser melhor ilustrada na figura 5.4.2.

Estes resultados acima corroboram com a idéia de que as substâncias presentes na FOESSB inibem as respostas álgicas protagonizadas pela indução da incapacitação articular, de forma aparentemente similar aos efeitos proporcionados por Celecoxib, que é um antagonista de ciclooxigenase 2, um sistema enzimático ativo em células imunológicas que participa da demodulação dos resíduos do ácido araquidônico enviando-os para cascatas específicas para a produção de diferentes tipos de moduladores, em diferentes rotas metabólicas celulares.

Aqui, talvez seja importante assinalar que este efeito analgésico neste tipo de modelo experimental sinaliza uma circunstancia um pouco diferente daquela em que os animais nos bioensaios de atividade espontânea exibiam. Neste caso temos uma ação pró-inflamatória instalada devido aos estímulos proporcionados pela Ovalbumina na implantação do modelo de incapacitação articular. Neste caso, possivelmente este efeitos inibitórios envolvem a produção de prostaglandinas, principalmente a  $\text{PGE}_2$  normalmente associada a estes processos. Também é importante lembrar que este tipo de prostaglandina pode modificar o limiar de excitabilidade de células nervosas, em especial os neurônios nociceptivos de condução lenta da via da percepção da dor. Estes neurônios podem aumentar cerca de mil vezes a velocidade de condução nestas células, intensificando as respostas álgicas. Uma inibição deste mecanismo contribuiria bastante para minimizar este tipo de dor inflamatória (ADAMS, 2003; GOLAN et al., 2009).

Tabela 5.4.2 Tempo de resposta à sensibilidade das patas de camundongos submetidos ao modelo de placa quente para avaliação da extensão da resposta analgésica. Grupos de animais controle, animais pré-tratados com Dexametazona (5mM ip), animais pré-tratados com Celecoxib (5mM ip) e animais tratados com a FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg.

<b>Grupos de tratamento</b>				
<b>Tempo de resposta (seg.)</b>				
<b>Animal</b>	<b>Controle</b>	<b>Dexametazona</b>	<b>Celecoxib</b>	<b>Sucupira</b>
1	7	5	20	8
2	8	7	16	10
3	9	5	16	12
4	4	6	11	10
5	5	6	17	16
6	5	8	12	11
7	4	6	16	15
8	7	7	10	16
9	7	4	11	3
Media	6,222	6,000	14,333	11,222
Desvio	1,787	1,225	3,428	4,207
CV	28,73	20,41	23,92	37,48
Probabilidade	-	0,381	5,3E-06*	0,0024* 0,052**

\*Diferença significativa em relação ao grupo controle para um valor de  $p < 0,05$  (gl + 16), (n = 9 animais por grupo). \*\*Diferença significativa em relação ao grupo onde os animais foram pré-tratados com Celecoxib para um valor de  $p < 0,1$ .

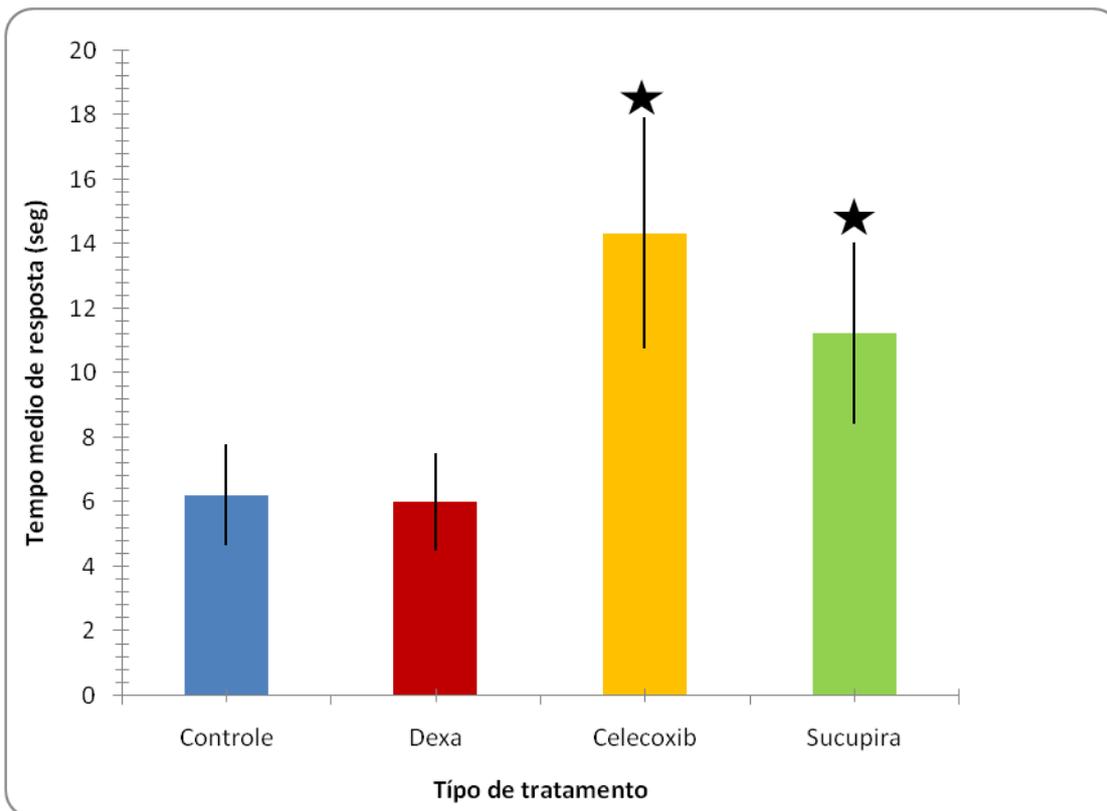


Figura 5.4.2 Tempo médio de resposta de animais provenientes de diferentes condições de tratamento em teste de analgesia em modelo de placa quente a 55°C. \* Diferença significativa para um valor de  $p < 0,05$ .

Em linhas gerais, a avaliação do processo nociceptivo desta forma, pode sinalizar uma importante resposta integrada no córtex cerebral, enquanto a simples agitação das patas posteriores (sapateado) geralmente é interpretada como sendo apenas uma resposta de integração medular (ALMEIDA E OLIVEIRA, 2006). Seja como for, verifica-se que as ações induzidas pela presença da Ovalbumina na cápsula articular dos animais estudados afetaram, de certa forma, o limiar de excitabilidade para a dor nas imediações centrais, onde geralmente espera-se que drogas semelhantes aos narcóticos atuem.

A sujeição dos mesmos animais avaliados nos testes de analgesia agora ao teste do plano inclinado permitiu a visualização de que a FOESSB conseguiu promover a recuperação dos animais de forma similar aos animais que receberam Celecoxib, em relação ao grupo controle, respectivamente  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , como mostram os dados da tabela 5.4.3 e Figura 5.4.3.

Tabela 5.4.3 Tempos de resposta dos animais de diferentes grupos de tratamento em teste do plano inclinado. Uma avaliação da condição de recuperação dos efeitos da incapacitação articular induzida por Ovalbumina.

<b>Tipos de tratamento</b>				
<b>Tempo de resposta (seg.)</b>				
<b>Animais</b>	<b>Controle</b>	<b>Dexametazona</b>	<b>Celecoxib</b>	<b>Sucupira</b>
<b>1</b>	<b>45</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>10</b>	<b>22</b>	<b>5</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>10</b>	<b>60</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>7</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>10</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
<b>9</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
<b>Media</b>	13,889	20,778	4,778	3,444
<b>Desvio</b>	11,667	17,042	2,279	1,740
<b>CV</b>	84,00	82,02	47,70	50,52
<b>Probabilidade</b>	-	0,165945	0,01764*	0,00862**
	-	-	-	0,09104***

\* Diferença significativa em relação ao grupo controle, para um valor de  $p < 0,05$ . \*\* Diferença significativa em relação ao grupo controle, para um valor de  $p < 0,01$ ; \*\*\* Diferença significativa em relação ao grupo cujo tratamento dos animais foi com Celecoxib, para um valor de  $p < 0,1$ .

Uma comparação rápida dos valores de probabilidade obtidos permite verificar que a FOESSB foi ligeiramente melhor em promover a recuperação dos organismos afetados, com tempos de resposta melhores.

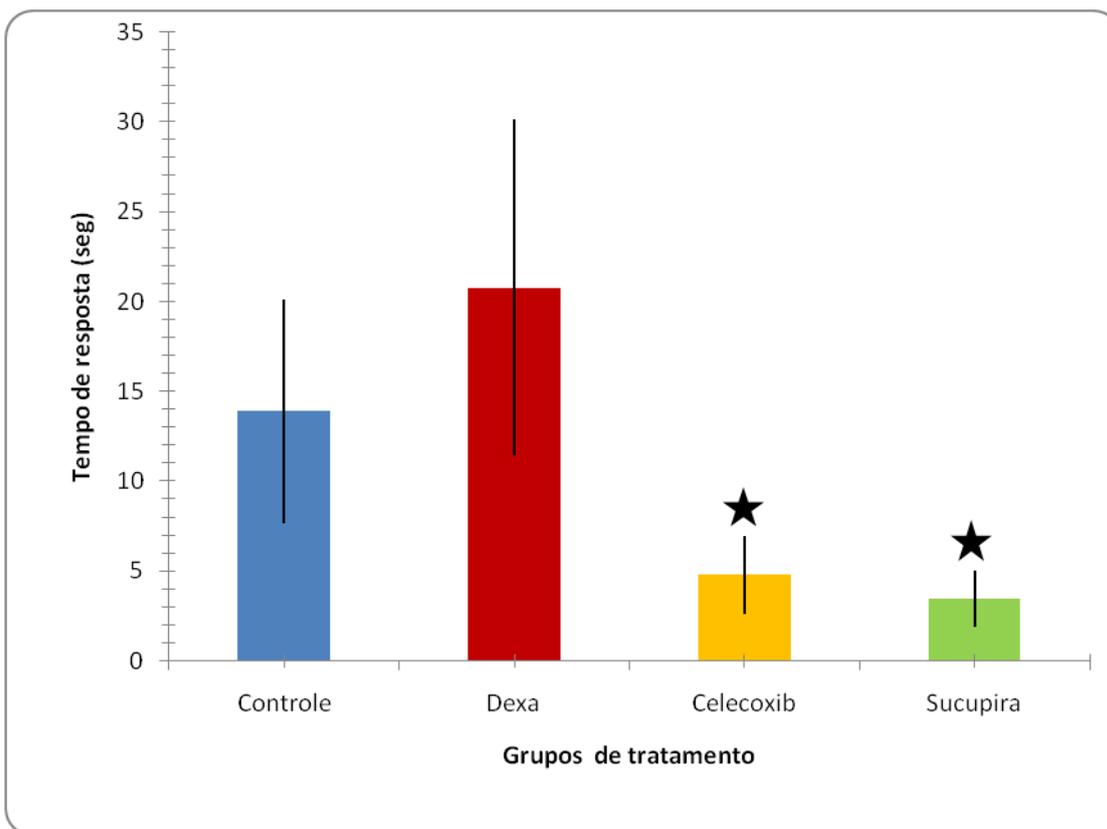


Figura 5.4.3 Tempos de resposta em teste de plano inclinado, de animais com incapacitação articular induzida por Ovalbumina, sob diferentes condições de tratamentos. \* Diferença estatística significativa para um valor de  $p < 0,05$ .

Na tabela 5.4.4, podem ser visualizados os valores médios dos pesos dos órgãos dos animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento. Afim, portanto, de se efetuar uma comparação destes valores entre os diferentes grupos de tratamento, providenciou-se a obtenção dos valores de peso dos órgãos da tabela 5.4.4 em termos de peso relativo, ou seja, levando-se em consideração o peso dos animais, conforme mostram os dados da tabela 5.4.5. A aplicação do teste estatístico t de Student verificou-se não haver diferenças estatísticas significativas entre os valores médios obtidos para o peso dos órgãos frente aos diferentes grupos avaliados.

Mas para efeito de curiosidade, na tabela 5.4.6 podem ser os percentuais de afetamento de cada tratamento sobre os órgãos extraídos dos organismos estudados. Bem, neste caso, verifica-se que o tratamento com dexametazona afetou o coração, o rim esquerdo e o baço, principalmente considerando um espaço temporal de apenas uma semana de tratamento. Também é interessante revelar que os animais do grupo tratado com dexametazona apresentavam-se edemaciados, e tiveram o processo de recuperação dos efeitos da

incapacitação articular retardados, onde os animais exibiam uma massa corpórea maior em relação aos animais dos demais grupos, assim como alterações de comportamento importantes, como agressividade e consumo elevado de alimentos e de água. Tudo indica que o estímulo antigênico promovido pela Ovalbumina modificou a forma com que a dexametazona promoveu a interação com os sítios metabólicos onde participa o sistema enzimático da fosfolipase, ou ainda promoveu inibições importantes nos mecanismos de recaptação extraneuronal nos sistemas de células nervosas noradrenérgicos, serotoninérgicos e dopaminérgico.

Tabela 5.4.4 Valores medios e respectivos desvios do peso dos órgãos de animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.

Grupos	Peso (g)						Corpo
	Coração	Pulmão	Fígado	Rim Direito	Rim Esquerdo	Baço	
<b>G1</b>							
Media	0,211	0,235	1,611	0,258	0,278	0,145	39,318
Desvio	0,043	0,044	0,341	0,039	0,020	0,025	4,022
CV	20,317	18,777	21,178	14,973	7,242	17,208	10,229
<b>G2</b>							
Media	0,216	0,264	1,630	0,308	0,261	0,145	44,432
Desvio	0,025	0,064	0,248	0,048	0,039	0,044	5,095
CV	11,416	24,409	15,235	15,454	14,954	30,652	11,467
<b>G3</b>							
Media	0,178	0,237	1,702	0,238	0,249	0,158	39,099
Desvio	0,017	0,042	0,220	0,034	0,028	0,044	1,733
CV	9,312	17,536	12,924	14,164	11,280	27,703	4,432
<b>G4</b>							
Media	0,184	0,247	1,733	0,265	0,260	0,136	41,257
Desvio	0,024	0,051	0,247	0,045	0,032	0,041	3,011
CV	13,000	20,797	14,245	16,834	12,152	30,380	7,297

G1 - Grupo controle; G2 – Animais tratados com Dexametazona; G3 – Animais tratados com

Celecoxib; G4 – Animais tratados com a fração orgânica do extrato hidroalcolico de sucupira; todos os grupos com n = 9.

Tabela 5.4.5 Valores medios relativos do peso dos órgãos de animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.

<b>Grupos de tratamento</b>				
	<b>Peso médio relativo (g/g de peso corpóreo)</b>			
	Controle	Dexametazona	Celecoxib	Sucupira
Coração	0,0036	0,0049	0,0046	0,0045
Pulmão	0,0060	0,0059	0,0061	0,0060
Fígado	0,0410	0,0367	0,0435	0,0420
Rim Direito	0,0066	0,0069	0,0061	0,0064
Rim Esquerdo	0,0071	0,0059	0,0064	0,0063
Baço	0,0037	0,0033	0,0040	0,0033
Probabilidade	-	0,4502	0,4922	0,4913

Diferenças não significativas para um valor de  $p < 0,05$ .

Tabela 5.4.6 Valores percentuais de afetamento sobre o peso dos órgãos em relação ao peso dos respectivos animais com incapacitação articular, sob diferentes condições de tratamento.

<b>Tratamentos</b>				
	<b>%</b>			
Órgãos	Dexametazona	Celecoxib	Sucupira	
Coração	9,317	14,927	16,713	
Pulmão	0,538	-1,702	-0,171	
Fígado	10,473	-6,226	-2,497	
Rim Direito	-5,562	7,279	2,155	
Rim Esquerdo	16,962	9,898	10,799	
Baço	11,311	-9,835	10,194	

Uma análise bioquímica do sangue dos animais com incapacitação articular dos diferentes grupos de tratamentos foi efetuada. Na figura 5.4.4 podem ser visualizados os valores obtidos para os níveis de uréia no sangue dos animais dos diferentes grupos. Tomando-se como referência o valor estimado para os níveis de uréia em camundongos normais de  $57,6 \pm 2,54$  mg/dL conforme assinala Vasconcelos, et al. (2007) verifica-se que os valores obtidos experimentalmente estão muito baixos, denotando no mínimo problemas com o metabolismo do nitrogênio em todos os animais; muito embora os animais tratados com Celecoxib e com FOESSB apresentaram valores maiores em relação aos demais grupos.

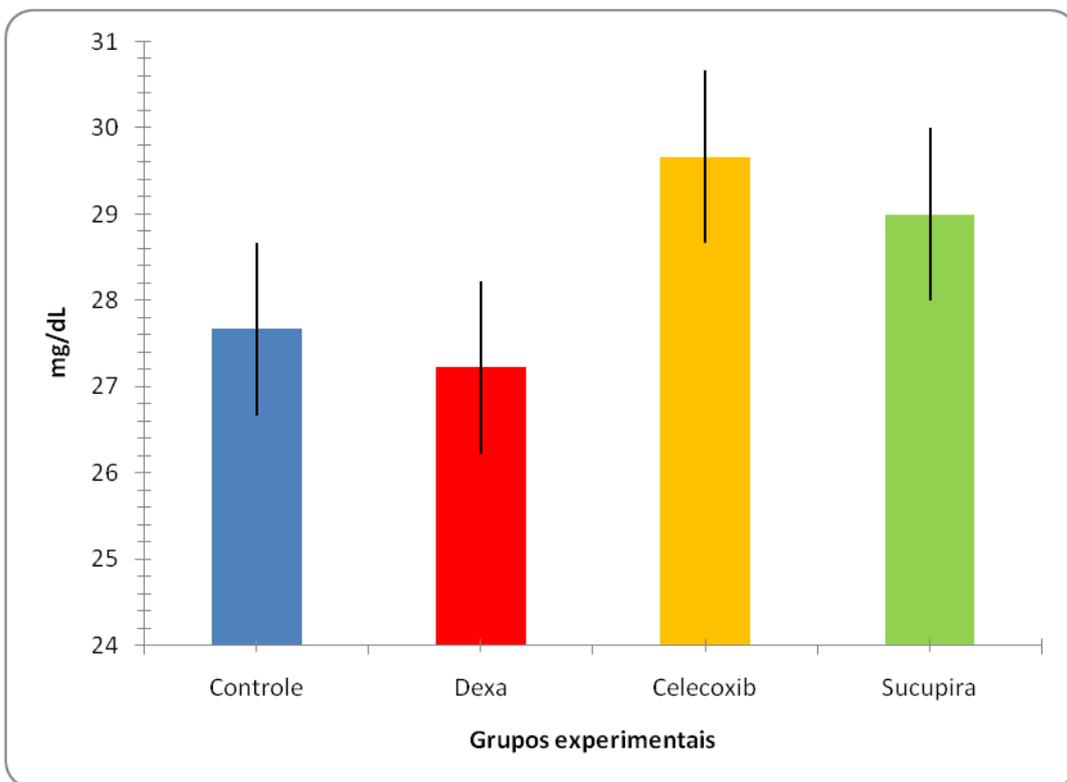


Figura 5.4.4 Níveis de ureia plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.

Na figura 5.4.5 podem ser visualizados os valores obtidos para os níveis de creatinina no sangue dos animais dos diferentes grupos de tratamento. Tomando-se como referência o valor estimado para os níveis de creatinina em camundongos normais de  $0,34 \pm 0,02$  mg/dL conforme assinala Vasconcelos, et al. (2007), verificou-se que os valores obtidos experimentalmente para o grupo controle estão relativamente normais, embora os animais tratados com Dexametazona, Celecoxib e FOESSB tenham apresentado valores ligeiramente mais elevados em relação aos animais do grupo controle. Esta elevação pode estar associada a dificuldades apresentadas pelo sistema renal em tentar administrar a carga dos substratos usados no tratamento, inclusive da FOESSB, com provável prejuízo nos mecanismos de fosforização de proteínas, ácidos nucleicos e outros substratos.

Dificuldades nos mecanismos de biotransformação de substratos ativos podem acabar gerando uma espécie de ciclo vicioso, uma vez que o processo de fosforilação também faz

parte dos mecanismos moleculares de oxiredução e conjugação associados por exemplo aos sistemas de citocromos localizados no tecido hepático.

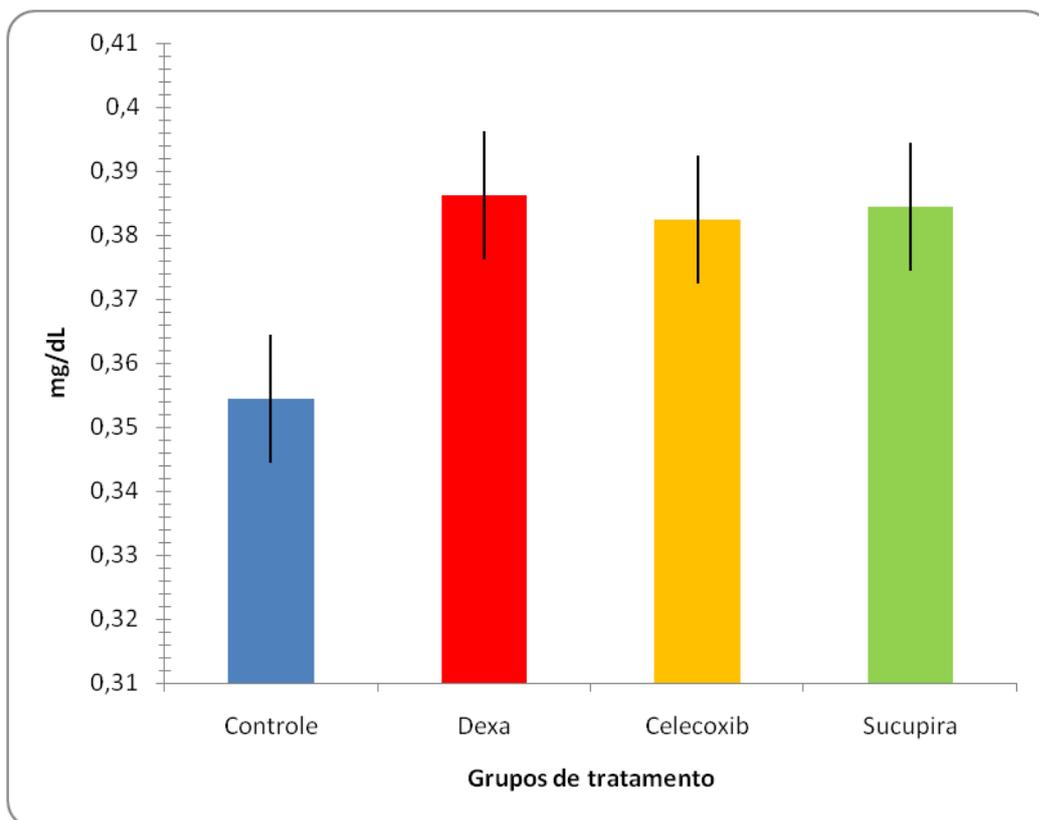


Figura 5.4.5 Níveis de creatinina plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.

Já na figura 5.4.6 tem-se os valores obtidos para os níveis de transaminase TGO/AST no sangue dos animais dos diferentes grupos. Comparando-se estes valores com o valor estimado para os níveis de TGO/AST em camundongos normais de  $50,60 \pm 6,13$  U/L conforme assinala Vasconcelos, et al. (2007), verificou-se que os valores obtidos experimentalmente estão extremamente elevados, principalmente os do grupo controle, sugerindo que o estímulo antigênico proporcionado pela Ovalbumina afetou outros domínios nestes organismos. Todos os animais dos demais grupos de tratamento apresentaram valores muito elevados, com exceção dos animais que receberam dexametazona na dose de 5mM (ip), muito embora o valor médio obtido tenha sido superior ao valor de referência obtido a partir da literatura. Seja como for, os demais tratamentos parece não afetar as transformações

metabólicas induzidas pela Ovalbumina, com exceção dos animais que receberam dexametazona.

Bem, considerando o papel do sistema enzimático da transaminase glutâmica oxalacética, ou mais modernamente a aspartato aminotransferase (AST), sobre diferentes etapas do metabolismo protéico, principalmente nos processos anabólicos, pode-se conjecturar um possível comprometimento de tecidos como o renal e o hepático, sinalizando a presença de um processo lesivo nestes órgãos.

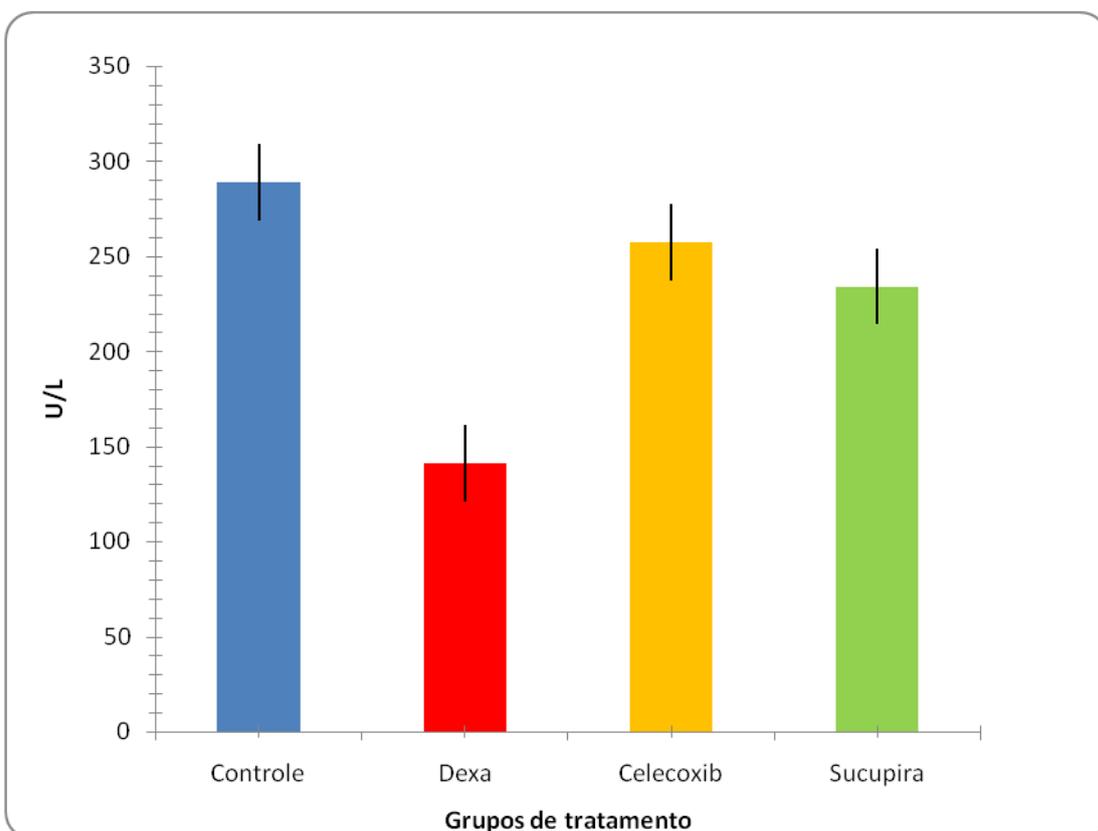


Figura 5.4.6 Níveis de transaminase TGO plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.

Já com relação ao sistema das transaminases TGP/ALT, mais especificamente o sistema de transaminases glutâmico pirúvica Na figura 5.4.7 são mostrados os valores obtidos experimentalmente para os níveis de transaminase no sangue dos animais dos diferentes grupos. Comparando-se estes valores com o valor estimado para os níveis de TGP/ALT em camundongos normais de  $77,20 \pm 8,65$  U/L conforme assinala Vasconcelos, et al (2007), verifica-se que os valores obtidos experimentalmente estão extremamente elevados, mostrando que os tratamentos dos animais dos demais grupos não revertem estes

parâmetros, embora os animais tratados com dexametazona e com celecoxib apresentaram valores para este sistema enzimático ainda maiores, denunciando a ocorrência de possíveis processos lesivos principalmente sobre o tecido hepático.

O engraçado é que alguns autores alegam não haver efeitos tóxicos protagonizados pelo óleo da semente de sucupira em camundongos (SABINO et al., 1996).

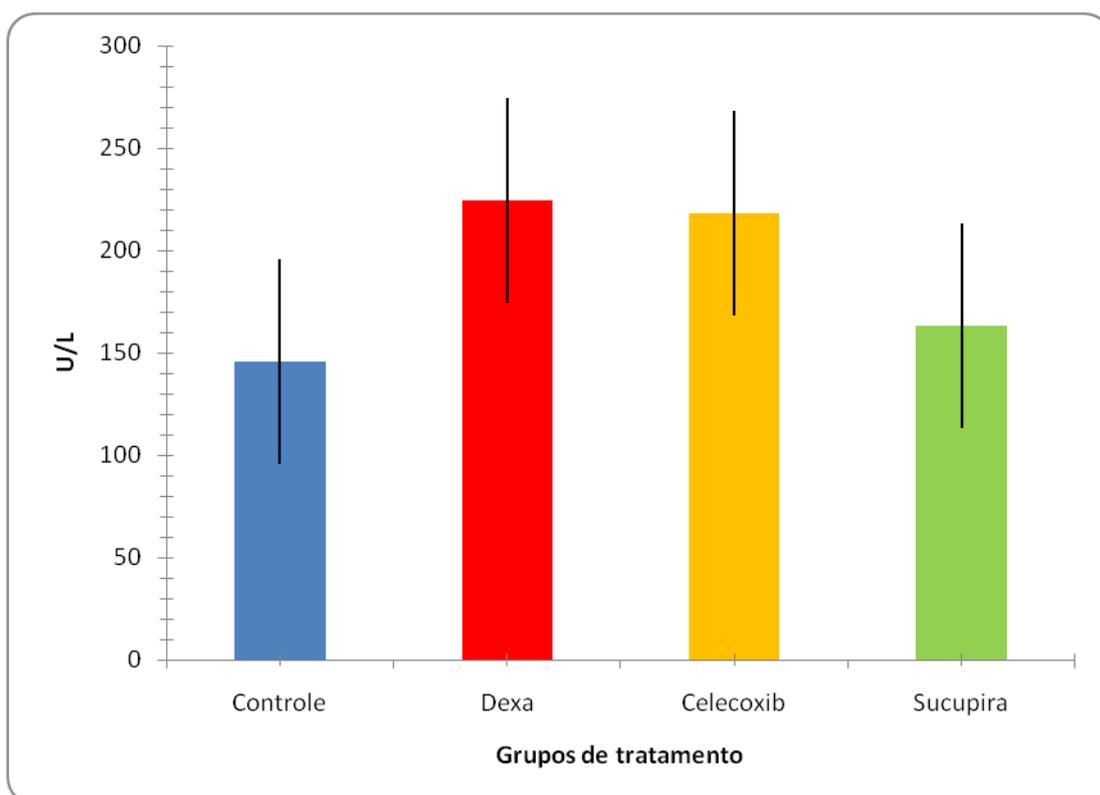


Figura 5.4.7 Níveis de transaminase TGP plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.

Na figura 5.4.8 são mostrados os valores obtidos experimentalmente para os níveis de fosfatase alcalina (FA) no sangue dos animais dos diferentes grupos. Comparando-se estes valores com o valor estimado para os níveis de (FA) em camundongos normais de  $149,4 \pm 16,99$  U/L conforme assinala Vasconcelos et al., (2007), verifica-se que os valores obtidos experimentalmente estão elevados, mostrando principalmente que os tratamentos dos animais com Celecoxib e FOESSB contribuíram para uma maior elevação dos valores. Considerando-se, entretanto, o papel que esta hidrolase tem sobre o metabolismo dos fosfatos, e sua transferência para outros grupos moleculares como proteínas, ácidos nucleicos, verifica-se que estes organismos foram afetados de forma significativa em seus sistemas metabólicos.

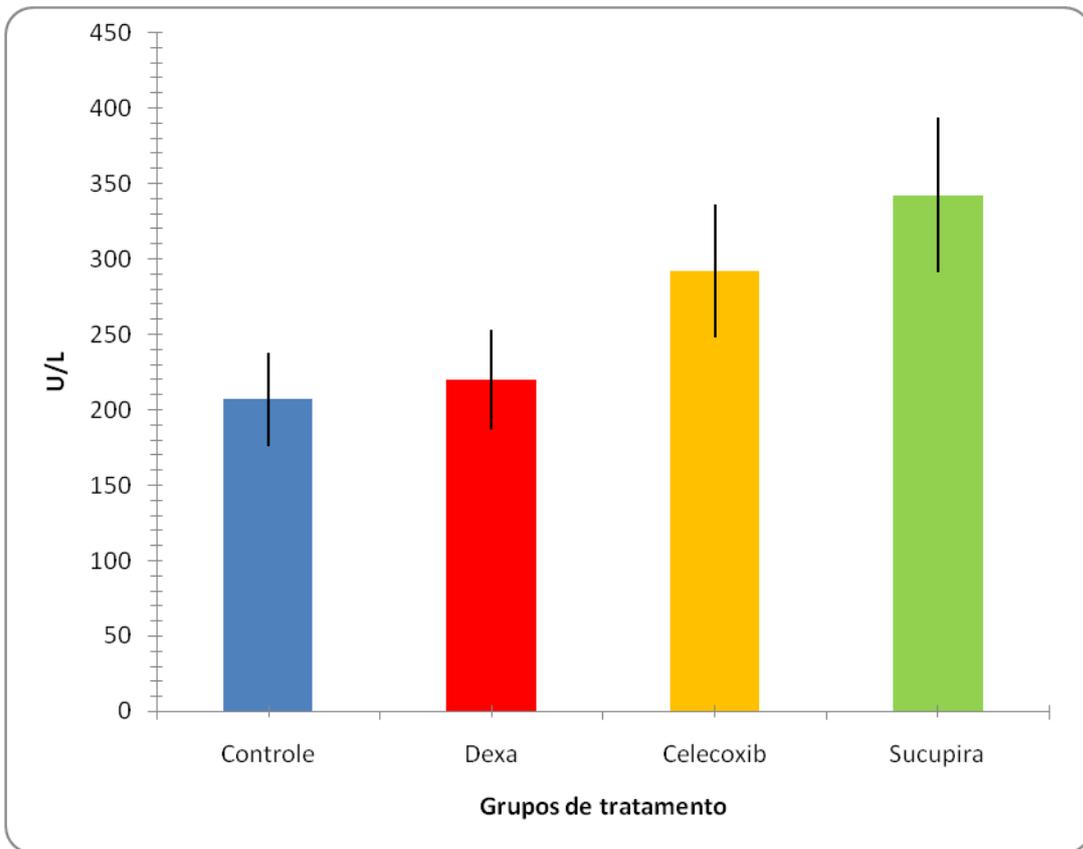


Figura 5.4.8 Níveis de fosfatase alcalina plasmática em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina e diferentes condições de pré-tratamento.

## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi realizado conclui-se que:

- Os bioensaios da atividade espontânea revelaram que a FOESSB proporcionou um elenco de respostas comportamentais característico, sinalizando efeitos estimulantes e depressores sobre o SNC, efeitos sobre o SNA além de outros efeitos diversos, cuja expressão foi característica conforme a dose empregada. Alguns dos efeitos observados revelaram uma relação do tipo dose/efeito.
- O extrato hidroalcolico da semente de sucupira branca na dose de 205,71 mg/Kg apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em modelo de incapacitação articular em camundongos.
- A fração orgânica do extrato de sucupira parece não influenciar nos parâmetros bioquímicos (TGO, TGP, FA, ureia e creatinina) e as alterações observadas estão, provavelmente relacionadas com o estímulo antigênico.
- A fração orgânica do extrato da semente de sucupira não apresentou alterações e variações macroscópicas nos órgãos estudados (coração, fígado, rim, pulmão e baço).
- Com a pesquisa detalhada e minuciosa destes compostos assegura-se a saúde da população e também torna a fração orgânica do extrato da semente de sucupira uma opção para o tratamento das afecções articulares de ordem inflamatória economicamente viável e segura, visando à minimização de efeitos colaterais no organismo pretende-se com esse estudo introduzir um fitoterápico como um medicamento eficaz para resolução deste problema.
- Não ocorreram óbitos nos bioensaios de atividade espontânea até uma dose de 9257,10 mg/Kg, muito embora, pelas relações de dose efeito encontradas em respostas associadas a importantes efeitos sobre o SNC, recomenda-se que para futuros trabalhos sejam empregadas doses inferiores a 385,71 mg/Kg.
- A FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg reduziu inflamação de forma significativa em modelo de implante de disco de algodão subcutâneo para um valor de  $p < 0,05$ . Os animais avaliados não exibiram alterações importantes em teste de ansiedade.

- A FOESSB na dose de 205,71 mg/Kg reduziu as respostas pró-inflamatórias associadas ao processo de incapacitação articular induzido por Ovalbumina de forma significativa para um valor de  $p < 0,01$ . Os animais tratados com Celecoxib na dose equivalente a 5mM apresentaram respostas inibitórias das reações pró-inflamatórias de forma significativa para um valor de  $p < 0,05$ . Os animais nesta etapa também não exibiram alterações comportamentais significativas em teste de ansiedade.
- A FOESSB na dose de 205,71 bem como Celecoxib reduziu de forma significativa as mudanças no limiar de excitabilidade às respostas álgicas, em modelo de placa quente a  $55^{\circ}\text{C}$ , em camundongos protagonizadas pela resposta antigênica da Ovalbumina, de forma significativa para um valor de  $p < 0,05$ .
- As avaliações bioquímicas dos parâmetros TGO, TGP, FA, uréia e creatinina revelaram que o estímulo antigênico teve, bem provavelmente, uma participação efetiva na elevação de todos estes parâmetros, com exceção dos níveis de uréia que estavam bem abaixo do esperado, em relação aos valores referenciais encontrados na literatura para os mesmos parâmetros em camundongos Swiss sadios.
- Dexametazona, Celecoxib e FOESSB potencializaram os níveis de creatinina nos animais avaliados de forma equivalente.
- Celecoxib e FOESSB não conseguiram reduzir os elevados níveis de TGO protagonizados pela estimulação antigênica da albumina; embora dexametazona tenha proporcionado alguma redução.
- Dexametazona e Celecoxib potencializaram os já elevados níveis de TGP em camundongos com incapacitação articular induzida por Ovalbumina.
- Celecoxib e FOESSB potencializaram os níveis de fosfatase alcalina, já elevados, em animais sob resposta antigênica protagonizada por Ovalbumina.
- Não foram encontradas diferenças significativas na avaliação macroscópica e pesagens, efetuadas sobre órgãos como fígado, rim, baço, pulmão e coração para um valor de  $p < 0,05$ .

- O extrato hidroalcoólico de semente de sucupira na dose de 205,71 mg/kg apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em modelo de incapacitação articular em camundongos

## **REFERÊNCIAS**

ABBAS, A. K.; LITCHAMAN, A. H.; POBER, J. S. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders, Philadelphia. 1994.

ADAMS, H. R. Autacóides e Drogas Antinflamatórias. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**, seção 4. 8ª. Edição , Guanabara Koogan. p.335-34. Rio de Janeiro. 2003.

ALICE, D. E SIVAPRAKASAM, K. Antibiotics and garlic clove extract – innibitory agents of cell wall degrading enzymes. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, 37, 1-4: 44-47. 1995.

ALMEIDA, F. R. C.; OLIVEIRA, F. S. Teste da placa quente, em: Avaliação de drogas analgésicas de ação central. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. Org. Reinaldo Nóbrega de Almeida. Capítulo 17. Ed. Guanabara Koogan, p. 184. Rio. Janeiro; 2006.

ALMEIDA, K. S.; FREITAS, F. L. C.; PEREIRA, T. F. C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro Profissional veterinário. **Revista Verde**, Mossoró. v.1, n.1, p.67-74 janeiro/junho de 2006.

ALMEIDA, R. N. Triagem farmacológica comportamental, capítulo 11, em **Psicofarmacologia, Fundamentos Práticos**; Guanabara Koogan, 131-137, 2006.

ARANDAS, F, S.; SENA, E. P. Drogas antiepilépticas, Capítulo 43 da Sessão 2, Farmacologia do Sistema Nervoso Central; em **Farmacologia**, Penildon Silva, Org; 7ª. Edição, Guanabara Koogan S. A.; p. 416 – 423, 2006.

ARRIAGA, A. C. M.; CASTRO, M. A. B.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R. Further dispartenoides isolated fron *Pterodon polygalacaeiflorus*. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, 1: 187-190. 2000.

BALLOU, S. P.; KUSNHER, I. Laboratory evaluation of inflammation. In: KELL LEY, W. **Testbook of rheumatology**. W. B. saunders, Philadelphia. 1993.

BARREIRA, S.; SCOLFORO, J. R. S.; BOTELHO, S. A.; MELLO, J. M. Estudo da estrutura da regeneração natural e da vegetação adulta de um cerrado senso strito para fins de manejo florestal. **Annals of Forest Science**, 61: 64-78. 2002.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response **Immunology Today** 15: 74-80. 1990.

BEEKMAN, A. C.; WOERDENABAG, H. J.; KAMPINGA, H. H.; KONINGS, A. W. T. Cytotoxicity of artemisin, a dimer of dihydroartemisin, artemisin and eupatoriopicrin as evaluated by the MTT and clonogenic assay. **Phitotherapy Research**. 10:140-144. 1996.

BENDAZZOLI, W. S. **Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica**. Mundo Saude. São Paulo. 2000.

BRAZ-FILHO, R. GOTTLIEB, O. R.; ASSUNPÇÃO, R. M. V. The isoflavones of *Pterodon pubecens*. **Phytochemistry**, 10: 2835-2836. 1971.

BRENNAN, R. J.; SCHIEST, R. H. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. **Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 356: 171-178. 1996.

BRINKER, W. O.,PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. Ed. Manole, p.231-255, 1986.

BROWN, C. Resistance mechanism to drugs. In: Brown, R.; Boger-Brown, U editors. **Cytotoxic drug resistance mechanisms**. Humana Press, Totowa. 1999.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica e de farmacognosia**. 1 ed. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. 1991.

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

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterpicos anti-inflamatórios: aspectos químicos farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd, Ribeirão Preto. 2004.

CARVALHO, F. C.; ARAÚJO, J. A . F; GARCIA, R.; PEREIRA, J. M. F, ALBUQUERQUE, V. M. Efeito do Corte da Parte Aérea na Sobrevivência do Marmeleiro ( CrotonSonderianusMuell. Arg.) **Rev. Bras. Zootec.** v. 30, p. 930-934, 2001.

CHARTONE-SOUZA, E. Bactérias ultra resistentes: uma guerra quase perdida. **Ciências Hoje**. 23: 26-35. 1998.

COELHO, L. P.; REIS, P. A.; CASTRO, F. L.; GAYER, C. R. M.; LOPES, C. S.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethnolic extract and fractions of Pterodon pubescens Beth. Seed. **Journal of ethnopharmacology**, 98: 109-119. 2005.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia Catalogo dos Dados Principais sobre Plantas Utilizados em Medicina e Farmácia**. Ed. Carlos Silva Araújo, Portugal. 1942.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica**.4 Ed. Editora Vozes, Petrópolis, p. 164-165. 2001.

COWEN, D. L. E HELFAND, W. H. **Pharmacy: an illustrated history**. Harry N. Abrans, Korea, p.272. 1990

CRAVEIRO, A . A., MACHADO, M. I. L.De aromas, insetos e plantas. **Revista ciências hoje**, v.4, p54-63. 1886.

CRAVEIRO, A . A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C.H.S, MATOS, F. J. A.;ALENCAR, J. W. ; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste**. 1 Ed. Edições UFC, Fortaleza. 1981.

CRAVEIRO, A . A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C.H.S, MATOS, F. J. A.& ALENCAR, J. W .Óleos essenciais de canelas silvestres regionais. **Ciência e Cultura**. v. 29, p. 445, 1977.

CRUZ, G. L. **Livro verde das plantas medicinais e industriais do Brasil**. v.2. Belo Horizonte. 1965.

DA LUZ DIAS, F.; TAKAHASHI, C. S.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; VICHENEWSKI, W.; SARTI, S. J. Genotoxicity of the natural cercaricides “sucupira” oil and eremanthine in

mammalian cells in vitro and in vivo. **Environmental and Molecular Mutagenesis** 26: 338-344. 1995.

DERAEDT, R.; JOUGNEY, S.; DELEVALCEE, F.; FALHOUT, M. Release of prostaglandin E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 51: 17-24. 1980.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. Editora UNESP, São Paulo. 1995.

DICKENSON, A.; BESSON, J. M. *The Pharmacology of pain*. Berlin. Springer, 1997.

DICKSON, M.; REDWOOD, H. Pharmaceutical reference prices. How do they work in practice? **Pharmacoeconomics**, 14: 471-479. 1998.

DIMAS, K.; DEMETZOS, C. MARSELLOS, M.; SOTIRIADOU, R.; MALAMAS, M.; KOKKINOPOULOS, D. Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines in vitro. **Planta Medica**, 64: 208-211. 1998.

DYRCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Editora Guanabara koogans S.A. Rio de Janeiro, p 9-14, 1990.

ELISABETSKY, E. **Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas**. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. ed. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editor UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis. 1999.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, 38: 137-143. 1993.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. In: Bennett, D. & May. *Moléstia articular dos cães e dos gatos*, C. 4ª ed. Editora Manole. São Paulo, vol. 2, cap. 149 p. 2833-2808, 1997.

FASCIO, M.; MORS, W. B.; GILBERT, B.; MAHJAN, P. J. R.; MONTEIRO, M. B.; DOS SANTOS FILHO, D.; VICHNEWSHI, W. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, 15: 201-203. 1976.

FERRI, P. H. "Química de produtos naturais: métodos gerais", **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência** – Um Guia de Estudo Interdisciplinar, In: Luiz Cláudio Di Stasi, p. 69-86, Ed. Unesp, p. 29-35, Ed. Unesp. 1995.

FRANDSON, R. D. **Anatomia e fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 429p. 1979.

FREITAS, P. C. D. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq e *Piper regnellii* (Miq) C. D. C. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 115p. São Paulo. 1999.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: Necessidade e oportunidade. **Revista brasileira de farmacognosia**. São Paulo, SP, p.178-182. 2005.

GARCIA, E. S.; SILVA, A.C.P.; GILBERTO, B. et al. **Biodiversidade:** perspectivas e oportunidade tecnológicas. Fitoterapicos. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap10/eloi.html>>. Acesso em: 25 nov. 2002.

GASPARRI, S. Estudo das atividades antioxidantes e mutagênicas/antimutagenicas induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus*. Dissertação ( mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil, 79p. Canoas, 2005.

GETTY, R. Sindesmologia (artrologia) generalidades. In: GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**.5.ed. Editora: Interamericana v.1. p.33-37. Rio de Janeiro. 1986.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. As bases farmacologicas da terapêutica. 11ed. Ed McGraw-Hill, p 585-600. Rio de Janeiro. 2007.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN-JR, A. H.; ARMSTRONG E, J.; ARMOSTRONG, A. W. **Farmacologia da Analgesia**, C. 16, Em Princípios de Farmacologia – A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia; 2ª. Ed. Guanabara Koogan S. A./Gen. .p. 240 – 259; 2009.

GUYNTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2002.

HALL, L.W. et al. Prevention and management of anaesthetic accidents and crises. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary anesthesia**. Saunders, London. p.507-533. 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Oxford, New York. 2000.

HARBONE, J. B. Recent Advances in Chemical Ecology.**Natural Product Reports Articles**, 14: 83-98. 1997.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Cytotoxic and antitumour activity of scopadulcic acid from scoporia dulcis L. **Phytotherapy Research**, 6: 6-9. 1992.

HICKMAN, J. **Veterinary orthopaedics**. Primeira edição, ed. Oliver and Boy, Londres, p. 266-268, 1964.

IKAN, R. **Natural products: a laboratory guide**. 2 ed. Academic Press, New York. 1991.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception.**Nature**. 413: 203-210. 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. p. 101-119. 1990.

KNOBLOCH, K.; CHAUDHURI, S. K.; KUBO, Y.; SANCHES, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: Brunke, E. Gruyter, G. Berlin. 1986.

KUBO, I., MUROI, H. &HIMEJIMA, M. Antibacterial activity against Streptococcus mutans of mate tea flavor components.**J. Agric. Food Chem**. v.41, p.107-111, 1996.

KUBO, I., CHAUDHURI, S. K.; KUBO, Y.; SANCHES, Y.; OGURA, T.; SAITO, T.; ISHIKAWA, H.; HARAGUCHI, H. Cytotoxic and antioxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca immuloides*. **Planta medica**.62: 427-430. 1996.

LANGMEAD, L.; RAMPTON, D.S. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease - benefits and dangers. **Alimentary pharmacology and therapeutics**, v. 15, p. 1293-1252, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA, M. M. T. R.; LIMA T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. CNPq – Programa Ibero-americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento. São Paulo. 91p. 2002.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969-978. 1988.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHP, R. O.; LIMA, T. C. M. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES C. O. M.; CHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis, 2000.

LEITE DE ALMEIDA, M. E.; GOTTLIEB, O. R. The Chemistry of Brazilian Leguminosae, further isoflavones from *Pterodon apparicia*. **Phytochemistry**, v. 14, p. 2716-2720, 1975.

LEITE, J. R.; SIQUEIRA, J. S. S.. Teste de esconder as esferas, em: Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. Capítulo 14. **Psicofarmacologia – Fundamentos Práticos**. Org. Reinaldo Nóbrega de Almeida. Ed. Guanabara Koogan, p. 158. Rio Janeiro; 2006.

LINDEN, P.; PALADINO, J. A. The economic impact of bacteremia due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: a case-control study. **38<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. San Diego. 1998.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras, manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 1, 4 ed, São Paulo, 242 p. 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Ed. Plantarum. 2000.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R.; Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e vale do Guaporé, Mato Grosso – Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 14: 45-46. 2004.

MAHADY, G. B. Global harmonization of herbal health claims. **Journal of nutrition**, 131: 1120-1123. 2001

MAHJAN, J. R.; MONTEIRO, M. B. New diterpenoids from *Pterodon emarginatus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 42: 103-107. 1990.

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *Journal of Ethnopharmacology*.8: 127-47, 1983.

MANN, J. **Secondary metabolismo**. 2 ed. Claredon Press, Oxford. 1987.

MARINHO, M. C. V.; BRITO, A. G.; CARVALHO, K. A.; BEZERRA-SANTOS, C. R.; ANDRADE, L. H. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAN, M. R. Amburana cearensis e Cumarina Imunomodulam os Níveis de anticorpos antígeno-específico em Camundongos BALB/c sensibilizados com Ovalbumina. **Acta Farmacologica Bonaerense** 23 (1): 47-52 2004.

MARQUES, D. D.; MACHADO, M. I. L.; CARVALHO M. G.; MELEIRA, L. A. C.; BRAZ-FILHO, R.; AUGHLIN, J. L.; Isoflavonoids and triterpenoids isolated from *Pterodon polygalaeflorus*. *Jornal of the Brazilian Chemistry Society*, 9: 295-301. 1998.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANE, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa: UFV. 220p. , 2000.

MATHIUS-MUNDY, E., MCCORKLE, C. M. Ethnoveterinary medicine: NA annotated MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA, F. **Revista Brasileira de Farmacologia** v.79, p. 84-87, 1998.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de fototerápicos**. Probe Editorial, São Paulo. 116 p. 1999.

MILLAN, M. J. Descending Control of Pain. **Progress in Neurobiology**, 57: 355-434. 2002.

MILLAN, M. J. The induction of Pain: An Integrative review. **Progress in Neurobiology**, 57: 1 - 164. 1999.

MORS, W. B.; SANTOS FILHO, M. F.; MONTEIRO, H. J.; GILBERT, B.; PELEGRINO, J. Chemoprophylactic agent in schistosomiasis: 14, 15- epoxigeranyl-geraniol. **Science**, 157: 950-951. 1967.

MOTHES, K. **Historical Introduction**. In: Bell, E. a.; Charlwood, B. V. *Secondary Plant Products*. Springer, Berlin. 1980.

NADAL-VICENS, M.; CHYUNG J. H.; & TURNER T. J. Farmacologia da Neurotransmissão Serotoninérgica e Adrenérgica Central. C. 13, Em **Princípios de Farmacologia – A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2ª. Ed. David E. Golan, Armen H. Tashjian, Jr, Ehrin J. Armstrong & April W. Armstrong (Orgs). Guanabara Koogan S. A./GEN, p. 186 – 202. Rio Janeiro. 2009.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. In: Taylor, S. M. *Manifestações clínicas de distúrbios articulares e teste diagnósticos*. 4º ed. Editora Elsevier. Rio de Janeiro, parte dez, cap.73, p. 1121 – 1143, 2010.

NEMIROVSKY, A.; CHEN, L.; ZELMAN, V. B.; JURNA, I. Interaction of combined administration of intratecal morphine with subcutaneous morphine or buprenorphine. **Acta Pharmacologica Sinica**, 21, 8: 685-689. 2000.

NUNAN, E. A.; CARVALHO, M. G.; PILO-VELOSO, D.; TURCHETTI-MAIA, R. M. M.; FERREIRA, M. P. **Dicionário Brasileiro de Plantas Mediciniais**. 2 ed. Editora Abril. São Paulo. 2001.

OLIVEIRA, A. C.; LEAL-CARDOSO, J. H.; SANTOS, C.F.; MORAIS, S.M.; COELHO-DE SOUZA, A .N. Antinociceptive effects of the essential oil of *Croton zehntnerii* mice. **Braz. J. M. Biol. Res.** . v.34, p.1471-1474, 2001.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos aniamais**. Terceira edição, ed. Manole, São Paulo, p.178-187, 1999.

PLETSCH, M. Composto natural biologicamente ativo: aplicação da biotecnologia a produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Biotecnologia ciência e desenvolvimento**. n.4, p.12-15, 1998. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. A transmissão química e a ação das drogas no sistema nervoso central, cap. 24. **Farmacologia**, 3<sup>a</sup>. Edição, Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro. p. 391 – 412, 1997.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PACHOALATO, A. B.; POOLES, 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 Pharmaceutical Sciences**, 387: 111-118. 2000.

ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia comparada dos vertebrados**. Atheneu. São Paulo. 559p. 1985.

SABINO, K. C. C.; CASTRO, F. A.; OLIVEIRA, J. C. R.; DALMAU, S. R. A.; COELHO, M. G. P. Successful treatment of collagen-induced arthritis in mice with a hydroalcoholic extrato f seeds of *Pterodon pubescens*. *Phitotherapy Research*, 13: 613-615. 1999.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidae activities of desinfectants against vancomycin-resist Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, 56: 140-144. 2006.

SHANNON, H. E.; LUTZ, E. A. Comparasion of the peripheral and central effects of the opioid agonist loperamide and morphine in the formalin test in rats. **Neuropharmacology**. 50: 30-35. 2002.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalina test: characteristic biophysic pain response. **Pain**. 38, 347-352. 1989.

SILVA P. Colinérgicos e anticolinérgicos. Capítulo 32, da Seção 1, Farmacologia Sistêmica parte 2, em **Farmacologia**, 7<sup>a</sup>. Edição. Guanabara Koogan S. A. p. 276-294, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 821p. 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Volateis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora UFRGS, Porto Alegre, Editora UFSC, Florianópolis. 2000.

SOUZA, M. A.; BORGES, R. S.O.S.; SOUZA, S.R. Apude: Martins. Propriedade antifúngica de extrato metabólico de Arruda (*Ruta graveolens*,L.) em ensaios in vitro e in vivo. **Revista Pesquisa em FOCO/UEMA**, p. 39-49, janeiro/junho, 2002.

STADNYK, A. W.; GAULDIE, J.The acute phase protein response during parasitic infection.**Immunology Today**.12. 7-12. 1991.

STORZ,G.; CHRISTMAN, M. F.; SIES, H.; AMES, B. N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhymurium*. **Proceedings of the Nacional Academy Sciences**. USA, 84: 8917-8921. 1987.

SWINGLE, K. F.; SHIDEMAN, F. E. Phases of response inflammatory response to sub-cutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents.*J. Pharmacol, Exp. Ther.* Bathesda; v. 183, n.1, p. 226-234, oct. 1972.

TEIXEIRA, P.C. **Do herbalismo tribal aos remédios florais do Dr. Babh**. São José do Rio Preto: São José, 33p. 1994.

TORRENEGRA, R.; BAUEREIB, P.; ACHEMBACH, H.Homoormosanine-type alkaloids from *Bowdichi virgiloides*. **Phytochemistry**. 28: 2219-2221. 1989.

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia** 17(4): 583-591, dez/2007.

VAZ, Z. R.; CECHINEL, FILHO, V.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive action of 2-(4-bromobenzoyl)-3methyl-4,6-dimetoxy benzofuran, a novel xanthoxylene derivative on chemical and thermal models nociceptionin mice. **Journal Pharmacology**. 1996.