



UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

LILIANE TRIVELLATO GRASSI

***Chenopodium ambrosioides* L. – ERVA DE SANTA MARIA
(AMARANTHACEAE): ESTUDO DO POTENCIAL
ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E CICATRIZANTE**

Itajaí – 2011

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

LILIANE TRIVELLATO GRASSI

***Chenopodium ambrosioides* L. – ERVA DE SANTA MARIA**
(AMARANTHACEAE): ESTUDO DO POTENCIAL
ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E CICATRIZANTE

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Márcia M. de Souza
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Angela Malheiros

Itajaí, Dezembro de 2011.

FICHA CATALOGRÁFICA

G768c Grassi, Liliane Trivellato, 1978-

Chenopodium ambrosioides L.- Erva de Santa Maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante [manuscrito] / Liliane Trivellato Grassi. – 2011.

147 f. : il. Color.

Cópia de computador (Printout(s)).

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí, Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, 2011.

“Orientadora: Profª. Drª. Márcia M. de Souza ”.

“Co-orientadora: Profª. Drª. Angela Malheiros

Bibliografia: f. 126-147.

1. Inflamação. 2. Cicatrização de feridas. 3. Amarantácea. I. Souza, Márcia M. de. II. Malheiros, Angela. III. Título.

CDU: 633.88

***CHENOPODIUM AMBROSIoidES L.* – ERVA DE SANTA MARIA
(AMARANTHACEAE): ESTUDO DO POTENCIAL
ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E CICATRIZANTE**

LILIANE TRIVELLATO GRASSI

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

Márcia Maria de Souza, Dra.
Orientadora

Angela Malheiros, Dra.
Co-Orientadora

Tânia Mari Bellé Bresolin, Dra.
Coordenadora do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

Dra. Márcia Maria de Souza (UNIVALI)
Presidente e Orientadora

Dra. Angela Malheiros (UNIVALI)
Co-orientadora

Dr. Sérgio Faloni de Andrade (UNIVALI)
Membro Interno

Dra. Daniela Cabrini (UFPR)
Membro Externo

Itajaí (SC), Dezembro de 2011

Dedico esta dissertação a todos que participaram e apoiaram,

desde quando era um sonho:

a Deus, por permiti-lo;

a Meus pais, Otávio e Zinha

pelo apoio e exemplo de vida e por ser o meu porto seguro;

Aos meus irmãos, Gislaine, Vera Mileide e Luís Otávio,

pela compreensão, incentivo e apoio incansável apesar da distância

a alcançar mais essa importante vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus que, de diversas formas, me enviou fé, força, saúde, determinação e autoconfiança para concluir este trabalho. E neste período, apresentou-me a abençoada oportunidade de me tornar uma pessoa melhor, mais madura e consciente.

A minha mãe por sofrer junto ou mais do que eu e mesmo assim nunca deixou de me encorajar e acreditar que eu conseguiria.

Ao meu pai por ser a minha proteção o meu porto seguro para o qual sempre vou poder voltar. Aos meus irmãos por serem os meus melhores amigos e terem tido paciência e me dado apoio emocional presente no telefonema entre lágrimas.

Obrigada a toda a minha família que sem exceção esteve presente esse tempo todo, vocês foram essenciais para que perseverasse diante das dificuldades encontradas.

Agradeço as minhas amigas Daniêlle, Carla, Claiza, Silvia, Juliana, Mariana, Ingrid, Simone, Marcelo, Bruna e muitos outros que sempre estiveram ao meu lado me dando força e torcendo por mim.

Agradeço a minha orientadora Márcia e a minhas co-orientadoras Angela e a Christiane Meyre, por me mostrarem na prática, o mais nobre significado da palavra “orientar”. Obrigada por serem exigentes, firmes, educadoras, e ao mesmo tempo, divertidas, companheiras e interessadas. Junto com os colegas de laboratório em especial a Maggie, Joel que tornaram tudo mais leve e agradável.

A equipe da Pra. Dra. Tânia Silva Frode da UFSC, pelos ensaios bioquímicos.

*A Dra. Kathryn Bortolini por todo apoio prestado nos
experimentos de pleurisia.*

*Agradeço aos grandes amigos que fiz durante esta jornada,
comecei sozinha e terminei sentindo-me parte de uma grande família.*

*Não posso deixar de agradecer a todos os funcionários da
Universidade do Vale do Itajaí: aos professores, aos secretários, as
serviçais, a todos os responsáveis pelos serviços que tanto utilizei,
como o biotério, muito obrigada.*

*Agradeço assim, a todos que fizeram parte deste caminho
de crescimento profissional e pessoal.*

Que Deus abençoe vocês!

Obrigada!

*“O Valor das coisas não está no tempo
em que elas duram,
mas na intensidade com que
acontecem.
Por isso existem momentos
inesquecíveis,
coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis”.*

(Fernando Pessoa).

***Chenopodium ambrosioides* L. – ERVA DE SANTA MARIA**
(AMARANTHACEAE): ESTUDO DO POTENCIAL
ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E CICATRIZANTE

LILIANE TRIVELLATO GRASSI

Dezembro/2011

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Maria de Souza.

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Malheiros.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas.

Número de Páginas: 147.

Chenopodium ambrosioides é uma planta medicinal conhecida popularmente como “Erva de Santa Maria”, sendo uma das 71 espécies escolhidas pelo RENISUS (Relação Nacional de Plantas de interesse do SUS/ Sistema de Saúde Nacional Brasileiro) com prioridade para estudos farmacológicos. São atribuídas pela população várias propriedades terapêuticas, sendo a mesma utilizada como agente anti-inflamatório, antifúngico, antitumoral, anti-helmíntico, cicatrizante, analgésico, antirreumático e antiulceroso. Há estudos científicos que comprovam algumas de suas propriedades como a ação anti-helmíntica, antitumoral e antifúngica. Entretanto, os estudos sobre sua atividade analgésica, cicatrizante e anti-inflamatória se mostraram bastante preliminares. O presente trabalho avaliou as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e cicatrizante do extrato etanólico das folhas e caules de *C. ambrosioides* através de modelos farmacológicos em camundongos e ratos. Para tanto, foram utilizados modelos farmacológicos de inflamação como os edemas de orelha e de pata e pleurisia, induzidos por diferentes agentes flogísticos. Em animais com pleurisia induzida por carragenina (Cg) foi avaliado o efeito do extrato sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima deaminase (ADA), níveis de óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Foi verificado o efeito antinociceptivo da planta através da analgesia induzida por formalina, PGE₂, capsaicina e bradicinina. O efeito cicatrizante do extrato foi verificado através do modelo de cicatrização cutânea. Adicionalmente procurando observar a ocorrência de efeitos adversos do extrato, foram realizados ensaios farmacológicos e/ou toxicológicos complementares, como o modelo de rota-rod, averiguação da temperatura retal e o ensaio de citotoxicidade pelo MTT. Para realização do modelo de edema de orelha os animais receberam tratamento tópico com extrato incorporado em um creme não iônico (1,3 e 5%). O edema foi induzido com óleo de cróton (1 μ g/orelha), capsaicina (CAP, 250 μ g/orelha) e ácido araquidônico (AA, 2mg/orelha). A resposta edematogênica foi avaliada utilizando-se micrômetro, através da diferença obtida entre a medida basal e a medida após a administração dos agentes irritantes em diferentes intervalos de tempo. No modelo de edema de pata, o extrato de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500mg/kg) foi administrado por via oral uma hora antes da injeção intraplantar de Cg 300 μ g/pata), substância P (SP 20 nmol/pata), bradicina (BK 3 nmol/pata) e prostaglandina E₂ (PGE₂ 3 nmol/pata). O edema foi medido com auxílio de pletismômetro em vários intervalos de tempo após a injeção dos agentes irritantes. A pleurisia foi induzida por Cg (1%), sendo avaliados os efeitos do extrato sobre a migração leucocitária. No modelo de cicatrização cutânea, o processo de cicatrização foi avaliado através das medidas (diárias) da área da lesão, por 19 dias consecutivos. Os resultados demonstraram que a administração do extrato de *C. ambrosioides* (em todas as concentrações) foi capaz de inibir significativamente os edemas provocados pelos agentes flogísticos testados nos modelos de inflamação acima citados. No modelo de pleurisia, observou-se inibição da migração de neutrófilos e monócitos para o sítio inflamatório após a administração do extrato. Além disso, o extrato foi capaz de reduzir

a atividade da MPO e da ADA, e inibiu os níveis de NO e TNF- α . No modelo de formalina o extrato reduziu a algesia nas duas fases (neurogênica e inflamatória) do processo doloroso, além de inibir a dor induzida por PGE₂, CAP e BK. Somente a pomada com extrato da planta incorporado 5% produziu efeito significativo no modelo de cicatrização. Finalmente, o extrato não alterou a performance motora e a temperatura corporal dos animais após o tratamento. Também não foram observados efeitos citotóxicos do extrato no teste preliminar de MTT. Estes resultados corroboram com outros já descritos na literatura sobre o efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e cicatrizante da planta e contribuem parcialmente para o uso da mesma.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*, inflamação, cicatrização, nocicepção.

***Chenopodium ambrosioides* L. – ERVA DE SANTA MARIA
(AMARANTHACEAE): STUDY OF ITS ANTI-INFLAMMATORY,
ANTINOCICEPTIVE AND HEALING POTENTIAL**

LILIANE TRIVELLATO GRASSI

December/2011

Supervisor: Márcia Maria de Souza, Dr^a.

Co-supervisor: Angela Malheiros, Dr^a.

Area of Concentration: Natural products and bioactive substances.

Number of Pages: 147.

Chenopodium ambrosioides is a medicinal plant popularly known as "Erva de Santa Maria", and is one of the seventy-one species chosen for inclusion in the RENISUS (National List of Plants of Interest to the SUS/Brazilian national health system) with priority for pharmacological studies. Several therapeutic properties are attributed to this plant, including anti-inflammatory, antifungal, antitumor, anthelmintic, healing, analgesic, antirheumatic and anti-ulcer properties. Scientific studies have confirmed some of these properties, such as its anthelmintic, antitumor and antifungal action. However, studies on its analgesic, healing, and anti-inflammatory activity are still incipient. The present work evaluated the anti-inflammatory, antinociceptive and healing activity of the ethanol extract of the leaves and stems of *C. ambrosioides*, through pharmacological models in mice and rats. Pharmacological models of inflammation were used, such as oedema of the ear and paw and pleurisy, induced by different phlogistic agents. In animals with pleurisy induced by carrageenan (Cg) was evaluated the effect of the extract on the activity of myeloperoxidase (MPO), enzyme deaminase (ADA), levels of nitric oxide and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was determined. The antinociceptive effect of the plant was determined through analgesia induced by formalin, PGE₂, capsaicin and bradykinin. The healing effect of the extract was determined through the model of cutaneous healing. This study also investigated the occurrence of adverse effects of the extract, using complementary pharmacological and/or toxicological, assays such as the rota-rod model, measurement of rectal temperature, and the cytotoxicity assay by MTT. To perform the model of ear oedema, the animals received topical treatment with extract incorporated in a nonionic cream (1.3 and 5%). Oedema was induced with croton oil (1 μ g / ear), capsaicin (CAP, 250 μ g / ear) and arachidonic acid (AA, 2 mg / ear). The oedematogenic response was evaluated using a micrometer, through the difference obtained between the basal measurement and measurement after the administration of the irritant agents at different time intervals. In the model of paw oedema, the extract of *C. ambrosioides* (150, 300 and 500mg/kg) was administered orally one hour before intraplantar injection of Cg (300 μ g/paw), substance P (SP 20 nmol/paw), bradycinin (BK 3 nmol/paw) and prostaglandin E₂ (PGE₂ 3 nmol/paw). The oedema was measured using a plethysmometer at various time intervals, following injection of the irritant agents. Pleurisy was induced by Cg (1%), and the effects of the extract on leukocyte migration were evaluated. In the model of cutaneous healing, the healing process was evaluated through measurements (daily) of the area the lesion, over 19 consecutive days. The results showed that administration of the extract of *C. ambrosioides* (in all concentrations) significantly inhibited the oedemas provoked by the phlogistic agents tested in the inflammation models cited above. In the model of pleurisy, inhibition of migration of neutrophils and monocytes to the inflammatory site was observed, after administration of the extract. In addition, the extract was able to reduce the activity of the MPO and ADA, and inhibit the NO and TNF- α levels. In the formalin model, the extract reduced the algesia in the two phases (neurogenic and inflammatory) of the painful process,

as well as inhibiting pain induced by PGE₂, CAP and BK. Only the ointment with 5% embedded plant extract produced a significant effect in the healing model. Finally, the extract did not alter the motor performance and body temperature of the animals after treatment. Nor were any cytotoxic effects of the extract observed in the preliminary MTT test. These results corroborate others already described in the literature on the antinociceptive, anti-inflammatory and healing effects of the plant, and contribute partially for the use thereof.

Key words: *Chenopodium ambrosioides*, inflammation, healing, nociception

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do papel das células no processo inflamatório.....	24
Figura 2	Comparação entre a circulação periférica no tecido vascular normal com o que acontece na inflamação aguda.....	25
Figura 3	Principais metabólitos envolvidos na cascata do ácido araquidônico	
Figura 4	Eventos celulares na inflamação	27
Figura 5	Principais metabólitos envolvidos na cascata do ácido araquidônico.....	30
Figura 6	Representação esquemática do diferentes tipos de nociceptores primários (fibras A α , A β , A δ e do tipo C).....	39
Figura 7	Mecanismos de transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas das terminações periféricas de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e descendentes (cor azul).....	40
Figura 8	Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização.....	50
Figura 9	Formas da cicatrização: a) cicatrização por primeira intenção; b) cicatrização por segunda intenção.....	54
Figura 10	Partes aéreas de <i>Chenopodium ambrosioides</i>	63
Figura 11	Fluxograma dos procedimentos cromatográficos do extrato etanólico das folhas e caules de <i>C. ambrosioides</i>	83
Figura 12	a) Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAA-38; b) Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAA-38....	84
Figura 13	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do CAA-38.....	85
Figura 14	Espectro de DEPT 135 (CDCl_3 , 75 MHz) do CAA-38.....	85
Figura 15	a) Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAD-15; b) Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAD-15....	86
Figura 16	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do CAD-15.....	87
Figura 17	Espectro de DEPT 135 (CDCl_3 , 75 MHz) do CAD-15.....	87
Figura 18	Efeito inibitório do creme a base do extrato etanólico bruto (EEB) de <i>C. ambrosioides</i> (1,3 e 5%) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (2,5/orelha) em camundongos.....	89
Figura 19	Efeito inibitório do creme a base do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (1,3 e 5%) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por capsaicina 250 μg /orelha em camundongos.....	89
Figura 20	Efeito inibitório do creme a base do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (1,3 e 5%) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico 2 mg/orelha em camundongos.....	90
Figura 21	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina 300 μg /pata em camundongos.....	91
Figura 22	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por PGE_2 3 nmol/pata em camundongos.....	92

Figura 22	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por SP 20 nmol/pata em camundongos.....	93
Figura 23	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10mg/kg) sobre o edema de pata induzido por BK 3 nmol/pata em camundongos.....	93
Figura 24	Efeito da administração oral do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150-500 mg/Kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre os eventos da pleurisia induzida por carragenina. A- leucócitos totais, B- mononucleares e C- neutrófilos. Coluna pontilhada animais que receberam água destilada + Tween por via oral / salina intrapleurial. Coluna negra - animais que receberam água destilada + Tween por via oral / carragenina 1% intrapleurial; colunas rachuradas- animais tratados via oral com doses diferentes do EEH de <i>C. ambrosioides</i> / carragenina intrapleurial e coluna branca- animais que receberam Indometacina 10 mg/Kg, via oral / carragenina intrapleurial.....	95
Figura 25	Efeitos de diferentes doses do extrato etanolico de <i>C. ambrosioides</i> (150-500 mg / kg, po) em inflamação induzida por carragenina (Cg, 1%) no modelo de pleurisia. Efeitos do CA em mieloperoxidase (A), atividades da adenosina deaminase (B), níveis de óxido nítrico (C) e produção de TNF- α (D). Sal = controle (animais tratados somente com solução salina estéril), Cg = animais tratados com carragenina, IND = animais tratados com indometacina (10 mg / kg, ip).....	97
Figura 26	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (50, 150, 300 e 500 mg/Kg, v.o) e indometacina (10 mg/Kg, v.o), (A) fase neurogênica (0-5'), (B) fase crônica (15-30') e (C) edematogênica, da analgesia induzida por formalina.....	98
Figura 27	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (50, 150, 300 e 500 mg/Kg, v.o) sobre a resposta nociceptiva induzida por PGE ₂ em camundongos..	99
Figura 28	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150, 300 e 500 mg/Kg, v.o), sobre a resposta nociceptiva induzida por capsaicina em camundongos	100
Figura 29	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> (150,300 e 500 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por bradicinina em camundongos.....	100
Figura 30	Análise macroscópica representativa das lesões cutâneas dos animais no 1, 7,14 e 19 dias de tratamento diário com PEG base e pomada de EEB a 5% a partir da lesão. Ratos Wistar machos (n=5/grupo) foram submetidos à única ferida incisional de 20 mm ...	101
Figura 31	Efeito do EEB de <i>C. ambrosioides</i> 5% em formulações farmacêuticas usando como base polietilenoglicol (PEG) sobre a cicatrização cutânea em ratos.....	103
Figura 32	Viabilidade das células L929 expostas ao EEB de <i>C. ambrosioides</i> utilizando como controle negativo meio MEM na concentração de zero mg/mL, incubadas por 24 horas a 37 °C em 5% CO ₂	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimento dos caules e folhas de <i>C. ambrosioides</i> do extrato EtOH em relação ao material vegetal utilizado	81
Tabela 2	Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C /DEPT obtidos para CAA-38 comparando com dados da literatura para o ascaridol.....	82
Tabela 3	Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C /DEPT obtidos para CAD-15 comparando com dados da literatura para o 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano.....	88
Tabela 4	Velocidade de cicatrização dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 1,7,14 e 18 após tratamento diário com pomada de EEB a 5%.....	102
Tabela 5	Efeito do tratamento do EEB de <i>C. ambrosioides</i> sobre a performance motora dos animais avaliados no teste de rota-rod.....	104
Tabela 6	Efeito do tratamento do EEB de <i>C. ambrosioides</i> no modelo de temperatura retal dos animais avaliados.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Ácido araquidônico

ACh – Acetilcolina

ADA – Enzima adenosina-deaminase

AMPC – Adenosina-monofosfato cíclico

AINES – Anti-inflamatório não esteroidais

ANOVA – Análise de variância

AR – Artrite reumatoide

AS – Anisaldeído Sulfúrico

ATP – Trifosfato de adenosina

AUC – Área sob a curva

BK – Bradicinina

CCD – Cromatografia de camada delgada

Cg – Carragenina

CGRP – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

COX – Ciclooxygenase

COX-1, COX-2, COX-3 – Ciclooxygenase 1, Ciclooxygenase 2, Ciclooxygenase 3

DAG – Diacilglicerol

EEB – Extrato etanólico bruto de *Chenopodium ambrosioides*

EGF – Fator de crescimento epidérmico

EPM – Erro Padrão Médio

IFN- γ – Interferon gama

IL– Interleucina

IM – Inibição Máxima

IgE – Imunoglobulina E

IP3 – Inositol trifosfato

i.p – Intraperitoneal

i.pl – Intraplantar

i.v – Intravenoso

His – Histamina

5-HT– Serotonina

LOX – Lipoxigenase

LPS – Lipopolissacarídeo
LT – Leucotrienos
MPO – Mieloperoxidase
NK – Natural killer
NGF – Fatores de crescimento neuronal
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintetase
OE – Óleo essencial
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAF – Fator de ativação plaquetária
PDGF– Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG – Polietilenoglicol
PGs – Prostaglandinas
PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGH₂ – Prostaglandinas D₂, E₂, F₂, H₂
PGI₂ – Prostaciclina I₂
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PLA₂ – Fosfolipase A₂
PMNs – Polimorfonucleares
Rf – Fator de Retenção
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
ROS – Espécies reativas de oxigênio
s.c – Sub-cutânea
SP – Substância P
TGF- β – Fator de crescimento de transformação beta
TNF-α – Fator de Necrose Tumoral - α
TPA – Acetato de 12-O-tetradecanoil-13-forbol
TRPV-1 – Receptor de potencial transitório vanilóide 1
TX, TXA₂ – Tromboxano, Tromboxano A₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVO.....	22
2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 Inflamação: aspectos gerais.....	23
3.2 Mediadores envolvidos na inflamação.....	27
3.3 Dor: aspectos gerais.....	36
3.4 Tratamentos farmacológico da inflamação e dor.....	44
3.4.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).....	44
3.4.2 GLICOCORTICOIDES.....	46
3.5 Cicatrização: aspectos gerais.....	48
3.5.1 Fases da cicatrização:.....	49
3.5.1.1 Fase Inflamatória ou exsudativa (coagulação e inflamação).....	49
3.5.1.2 Fase Proliferativa ou reconstrução.....	50
3.5.1.3 Fase de Maturação ou modulação (contração da ferida ou remodelação).....	52
3.6 Fármacos cicatrizantes.....	55
3.7 Algumas plantas medicinais com propriedade anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante.....	56
3.8 Família Chenopodiaceae e o gênero <i>Chenopodium</i>.....	61
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1 Material vegetal.....	67
4.2 Obtenção dos extratos e purificação dos compostos.....	67
4.3 Incorporação do extrato etanólico em creme e pomada.....	68
4.4 Avaliação farmacológica.....	70
4.4.1 Animais.....	70
4.4.2 Drogas e soluções.....	70

4.4.3 Avaliação da propriedade anti-inflamatória.....	71
4.4.3.1 Modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos.....	71
4.4.3.2 Modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.....	72
4.4.3.3 Pleurisia induzida por carragenina.....	72
4.4.3.4 Quantificação da mieloperoxidase (MPO) e determinação da enzima adenosina-deaminase (ADA) em atividades induzida por carragenina.....	73
4.4.3.5 Análise dos níveis de TNF- α e Oxido nítrico.....	74
4.4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelos de dor aguda.	75
4.4.4.1 Nocicepção induzida por Formalina.....	75
4.4.4.2 Nocicepção induzida por PGE ₂ , Capsaicina e Bradicinina.....	75
4.4.5 Avaliação da atividade cicatrizante.....	76
4.4.5.1 Indução do processo ulcerativo (cicatrização cutânea).....	76
4.4.6 Modelos adicionais.....	77
4.4.6.1 Efeito sobre a performance motora (rota-rod).....	77
4.4.6.2 Medida da temperatura retal.....	77
4.4.7 Avaliação citotóxica preliminar.....	78
4.4.7.1 Ensaio da citotoxicidade (MTT).....	79
4.5 Análise estatística.....	80
5 RESULTADOS.....	81
5.1 Obtenção e fracionamento do extrato EtOH das folhas de <i>C. ambrosioides</i>.....	81
5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	88
5.2.1 Edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos.....	88
5.2.2 Edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos.....	90
5.2.3 Pleurisia induzida por carragenina.....	94
5.2.4 Atividade da mieloperoxidase (MPO) e enzima adenosina-deaminase (ADA), sobre os níveis de produção de óxido nítrico e TNF- α	95
5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva.....	97
5.3.1 Nocicepção induzida por Formalina.....	97

5.3.2 Nocicepção induzida por PGE₂	99
5.3.3 Nocicepção induzida por Capsaicina	99
5.3.4 Nocicepção induzida por Bradicinina	100
5.4 Avaliação da atividade cicatrizante	101
5.4.1 Indução do processo ulcerativo (cicatrização cutânea)	101
5.5 Modelos adicionais	103
5.5.1 Efeito sobre a performance motora (rota-rod)	103
5.5.2 Medida da temperatura retal	104
5.6 Avaliação da citotoxicidade	105
5.6.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)	105
6 DISCUSSÃO	106
7 CONCLUSÃO	125
REFERÊNCIAS	126

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram e continuam sendo utilizadas no tratamento e prevenção de diversas patologias. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas, provavelmente tenha sido umas das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, sendo assim, contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas (BUTLER, 2008; KINGSTON, 2011).

No que tange aos efeitos terapêuticos das plantas sobre os processos doloroso, inflamatório e cicatrizante, o uso de plantas é relevante, porém, a comprovação científica é ainda incipiente. Desta forma, se faz necessário que estudos continuem sendo realizados no sentido de buscar novos medicamentos com mais efetividade do que os existentes como os anti-inflamatórios, com menos efeitos adversos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O Brasil possui uma grande biodiversidade, sendo considerada uma das maiores no mundo. De toda biodiversidade mundial, estima-se que cerca de 15 a 20%, esteja concentrada neste país, o qual é considerado como um berço inesgotável de novas substâncias biologicamente ativas. Entretanto, apenas uma pequena parcela, em torno de 8% desta biodiversidade foi estudada até o momento (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Atualmente, embora não seja uma realidade brasileira, os fitoterápicos (elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais) e fitofármacos (substâncias ativas isoladas) vêm sendo amplamente utilizados, sendo observado um crescimento em torno de 15% para este mercado nos últimos anos. Isso se deve principalmente aos bons efeitos farmacológicos, aos “menores efeitos adversos”, a qualidade e o rigor exigido pela legislação vigente além de seu valor comercial, que geralmente tende a ser menor, quando comparado aos medicamentos sintéticos tornando-os mais acessíveis às classes sociais de baixa renda (CARVALHO et al., 2008).

Ao longo dos anos, várias plantas utilizadas na medicina popular brasileira, tiveram suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias comprovadas através de modelos farmacológicos específicos (BRAZ FILHO, 2010). Entretanto, pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais, tanto na forma de fitoterápicos e/ou fitofármacos para esse fim ainda são poucas. Particularmente,

alguns dados têm mostrado que a utilização de plantas como *C. ambrosioides* (Erva de Santa Maria) pode apresentar benefícios diversos à saúde. No Mato Grosso, a planta em questão é bastante utilizada na medicina popular, principalmente no tratamento de feridas abertas, decorrentes ou não de processos inflamatórios. O uso costumeiro do povo da região é macerar as partes aéreas da planta e usá-la na forma de emplastro sobre a pele lesionada. Além disso, a planta é associada ao cardápio de crianças e adultos com o intuito de tratamento de parasitoses, principalmente no tratamento de helmintos (DI STASI; SANTOS; SANTOS, 1987).

Cientificamente Ibironke e colaboradores (2007), estudaram a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas secas de *C. ambrosioides* em camundongos. O extrato mostrou ser eficaz em reduzir os processos inflamatório e nociceptivo, porém os estudos mostraram-se bastante preliminares não vislumbrando os mecanismos pelos quais tais atividades poderiam ocorrer.

Em 2009 o Ministério da Saúde selecionou a *C. ambrosioides* como uma das plantas de interesse ao SUS (RENISUS). Dessa forma, considerando seus usos na medicina popular, na terapêutica da inflamação, da dor e da cicatrização e a carência de trabalhos científicos validando essas propriedades farmacológicas, o presente trabalho pretende contribuir para esclarecer o potencial terapêutico da planta em processos dolorosos e inflamatórios agudos, em processo de cicatrização, bem como contribuir para o seu uso através de teste de citotoxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar as atividades anti-inflamatórias, antinociceptiva e cicatrizante do extrato etanólico obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides* L., através de modelos farmacológicos específicos além de sua composição química através de procedimentos cromatográficos.

2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Obter o extrato e isolar as substâncias majoritárias através de técnicas cromatográficas e identificar os componentes isolados através da técnica de ressonância magnética nuclear;
- ✓ Avaliar o efeito antiedematogênico do extrato etanólico, através do modelo de edema de orelha e de pata induzida por diferentes agentes flogísticos (óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina, carragenina, prostaglandina E₂, substância P, bradicinina);
- ✓ Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico, através do modelo de pleurisia induzida por carragenina;
- ✓ Avaliar o efeito do extrato etanólico sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) e enzima adenosina-deaminase (ADA), sobre os níveis de produção de óxido nítrico e TNF α ;
- ✓ Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico na nocicepção induzida por formalina, prostaglandina E₂, capsaicina, bradicinina;
- ✓ Avaliar o efeito do extrato etanólico sobre a cicatrização de feridas cutâneas abertas;
- ✓ Comparar os efeitos obtidos pelo extrato etanólico, com fármacos anti-inflamatórios clássicos;
- ✓ Verificar se o extrato etanólico obtido de *C. ambrosioides*, interferem na performance motora e temperatura corporal dos animais;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico em células L929, através do método sal de tetrazólio (MTT).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Inflamação: aspectos gerais

Inflamação é um processo fisiológico que ocorre nos tecidos em respostas a lesões traumáticas, pós-isquêmicas, tóxicas ou autoimunes, além de processos infecciosos. O processo inflamatório tem como objetivo proteger o organismo contra infecções, eliminar patógenos e reparar os tecidos após eventuais danos (MONTENEGRO; FRANCO, 2008). Assim, o processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais (HANSSON, 2005).

O termo inflamação deriva do latim “inflammatio” que significa “atear fogo”. Celsius descreveu há mais de 2000 anos os quatro sinais cardinais principais da inflamação: o rubor e o calor são resultados de um aumento da circulação na área inflamada, esse aumento deve-se à hiperemia, onde há um maior afluxo de sangue arterial, o edema (decorre do aumento da permeabilidade vascular) e a dor (causada pela irritação química nas terminações nervosas e pela compressão mecânica). No século XIX Virchow acrescentou o quinto sinal da inflamação, a perda da função dos órgãos (consequência de uma série de fatores, especialmente do edema e da dor). Quando o processo reparatório se completa naturalmente, o processo inflamatório em si, e os sinais da inflamação tendem a desaparecer (Figura 1) (LIMA et al., 2011).

Como previamente comentado, as causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável. O processo inflamatório envolve uma série de fenômenos que podem ser desencadeados por diferentes tipos de agentes causadores: biológicos (como bactérias, vírus, protozoários); químicos (como ácidos, álcalis, substâncias cáusticas, formaldeído, venenos, substâncias irritantes e outros) e físicos (calor excessivo, frio exagerado, radiação ultravioleta e ionizante, queimadura, eletricidade, traumatismos, fraturas e incisões) (LIEW, 2003).

Figura 1. Representação esquemática do papel dos sinais cardinais observados no processo inflamatório. Retirado de <http://patofisio.wordpress.com/2010/04/20/inflamacao/>, acessado em 14 de outubro de 2011.



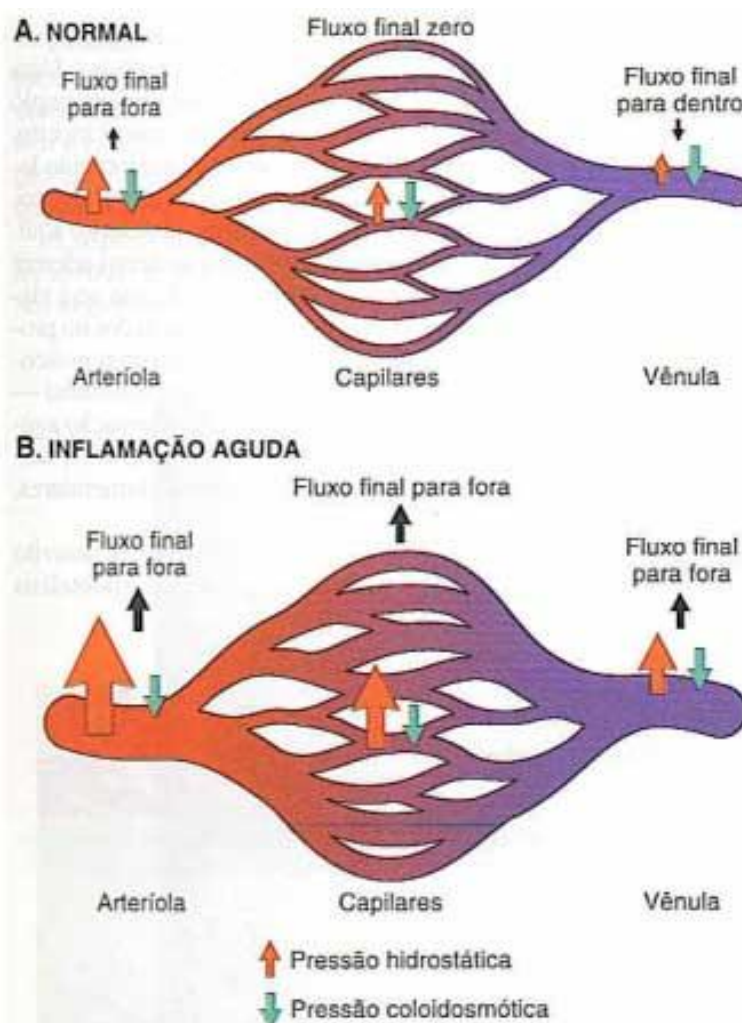
Quando se utiliza o critério temporal (duração) o processo inflamatório se divide em duas categorias: inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda constitui um dos mais importantes mecanismos de defesa contra patógenos invasores, é de curta duração (horas a dias) caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular, edema e migração de células inflamatórias sendo primariamente os neutrófilos, (Figura 2) (CHIU, et al., 2011)

A inflamação crônica é sempre precedida pela inflamação aguda, tem uma duração mais longa (semanas, meses ou até anos) e se caracteriza por migração leucocitária, principalmente monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, proliferação de vasos e tecido conjuntivo, além de sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva (FERGUSON, 2010). É um fenômeno indesejável persistente que pode levar ao desenvolvimento de doenças inflamatórias como: aterosclerose, obesidade, doença cardiovascular, artrite reumatoide, câncer e doenças neurodegenerativa como Parkinson e Alzheimer (CHIU et al., 2011).

As alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Elas consistem em vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação de

plasma (LIMA et al., 2007). Em condições normais a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas, as proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório, a microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (Figura 2) (GILROY et al., 2004; LIMA et al., 2011).

Figura 2. Comparação entre a circulação periférica no tecido vascular normal com o que acontece na inflamação aguda. Retirado de <http://leapato.blogspot.com/>, acessado em 14 de outubro de 2011.



A característica mais clássica da inflamação aguda é a vasodilatação, que é produzida por diversos mediadores como: Histamina (His), Prostaglandina E_2 (PGE_2), Interleucina do tipo 1β ($IL-1\beta$), óxido nítrico (NO) e outros. Primeiramente a vasodilatação é mediada pelo NO e prostaglandinas vasodilatadoras (PGE_2 e PGI_2).

O NO é produzido a partir da L-arginina através da ação do óxido nítrico sintase (NOS). Os leucócitos ativados produzem NOS indutível depois da exposição a produtos microbianos e citocinas pró-inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001; CHIU et al., 2011)

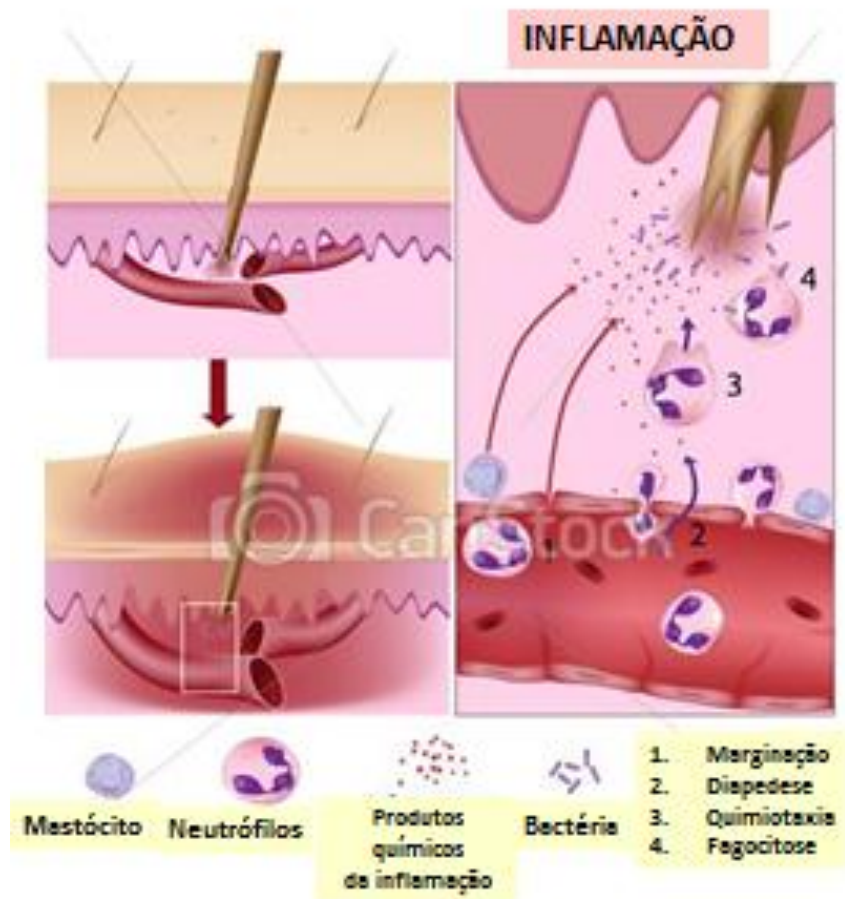
O exsudado líquido (edema) é provocado por fluxo de proteínas do leito vascular para o interstício como resultado da ação de mediadores como a His, bradicinina (BK), leucotrienos B₄ (LTB₄), substância P (SP), componentes do sistema complemento e fator de ativação plaquetária (PAF) (DENZLINGER et al., 1985). Estes mediadores favorecem o aumento da permeabilidade capilar e venular ao plasma e proteínas. O edema inflamatório é a marca registrada da inflamação aguda (ARYA; KUMAR, 2005).

A vasodilatação e o edema vêm acompanhados de marginação leucocitária, adesão e migração. O processo de migração de neutrófilos do espaço intravascular para o interstício ocorre a princípio nas vênulas pós-capilares da circulação sistêmica e capilares (Figura 3). Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos (principalmente neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como: rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme, transmigração ou diapedese e quimiotaxia. Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais de moléculas denominadas moléculas de adesão (selectinas que são formadas por três proteínas E-selectina, P-selectina e a L-selectina, as integrinas, as imunoglobulinas e as caderinas), de mediadores quimiotáticos (como a interleucina-8 (IL-8), o fator do complemento C5a e o leucotrieno B₄ (LTB₄)) (WEBER, 2003; KELLY; KWANG; KUBES, 2007).

Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, e logo nos estágios iniciais, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado tais como: células endoteliais, células mesoteliais,

mastócitos, eosinófilos, macrófagos e alguns linfócitos (FRANCISCHETTI et al., 2010).

Figura 3. Eventos celulares na inflamação. Retirado de <http://www.canstockphoto.com/inflammation-response-6235012.html>, acessado em 14 de outubro de 2011.



3.2 Mediadores envolvidos na inflamação

A lesão tecidual ou o trauma promove a liberação de vários mediadores químicos, podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas (His, Serotonina (5-HT)), SP, PAF, derivados do ácido araquidônico (PGs, tromboxano e leucotrienos), NO, citocinas (interferons (IFN)), numerosas interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral (TNF) ou de origem plasmática, como os componentes do sistema complemento, cininas (bradicina) e fatores de coagulação (HOFSETH, 2008).

a) Aminas vasoativas: His e 5-HT

As duas aminas, His e 5-HT, são especificamente importantes porque estão disponíveis em reservas pré-formadas e estão entre os primeiros mediadores a serem liberados durante a inflamação (MACGLASHAN, 2003).

A His é amplamente distribuída nos tecidos é sintetizada e liberada por diferentes células, especialmente mastócitos, basófilos e plaquetas, sendo liberada por exocitose (fase imediata ou inicial da inflamação) durante as reações inflamatórias ou alérgicas com participação do sistema complemento (C3a e C5a), Imunoglobulina E (IgE), citocinas (IL-1 e IL-8) e SP (HEBERT; JUST; SCHIMIDT, 2001).

A His desempenha papéis importantes na resposta inflamatória, onde seus efeitos são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores histamínicos específicos associados à proteína G. O receptor H1 (HR1) é o responsável por muitos sintomas das doenças alérgicas, tais como o prurido, o broncoespasmo e a contração da musculatura lisa intestinal. Quando estimulado, pode ativar outras vias de sinalização intracelular, tais como a via da fosfolipase D e a da fosfolipase A, provocando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. O receptor H2 (HR2) estimula a secreção gástrica e acelera a frequência cardíaca, o receptor H3 (HR3) está localizado no Sistema Nervoso Central e periférico, inibe a liberação e síntese de histamina. O receptor H4 (HR4) estimula a quimiotaxia de eosinófilos e mastócitos (CRIADO et al., 2010)

A 5-HT é o segundo mediador vasoativo pré-formado com ações semelhantes a His. Está presente nas plaquetas e nos mastócitos, promove o aumento da permeabilidade e vasoconstrição. A liberação de serotonina das plaquetas é estimulada quando ocorre à agregação plaquetária após contato com colágeno, adenosina difosfato (ADP) e complexos antígeno-anticorpo. A 5-HT atua na regulação da função gastrointestinal (peristaltismo), gerando um aumento da atividade pró-cinética no intestino e também na musculatura lisa contraindo-a. Existe cerca de sete tipos principais de receptores (5-HT₁₋₇) a maioria está acoplada a proteína G, exceto o 5-HT₃, que é um canal de cátions controlado por ligante (GOADSBY; LIPTON; FERRARI, 2002).

b) Neuropeptídios - SP

A SP é um neurotransmissor presente no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal, onde pode agir sobre o sistema nervoso entérico. É um dos mais

potentes vasodilatadores, atuam sobre os mastócitos liberando His, que potencializa a resposta inflamatória, aumentando a permeabilidade vascular, também participa da regulação sanguínea (bradicinina), é responsável pela modulação e sensação de dolorosa. Níveis elevados da SP aumentam a sensibilidade dos nervos à dor ou aumentam a consciência da dor, fazendo com que estímulos normais resultem em percepção exagerada de dor. A liberação aumentada da SP é influenciada pelos baixos níveis de Serotonina. As endorfinas bloqueiam a liberação da SP, motivo pelo qual os exercícios físicos são importantes para a redução da sensação dolorosa (O'CONNOR et al., 2004; LI et al., 2011).

c) Derivados do ácido araquidônico: eicosanóides

O ácido araquidônico (AA) é liberado pelos fosfolipídios das membranas celulares através de alguns estímulos (químicos, inflamatórios, traumáticos e miogênicos) e ou por mediadores, a partir da ativação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) e este é precursor de vários eicosanóides. O AA é liberado na inflamação a partir da membrana dos glóbulos brancos ativados, e fundamental para a inflamação, pois a sua metabolização gera vários mediadores inflamatórios como prostaglandinas. Existem duas vias que o AA pode seguir simultaneamente após ser sintetizado: via ciclooxygenases 1, 2 e 3 (COX-1, COX-2 e COX-3) e via da lipoxigenase (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006, YEDGAR et al., 2007).

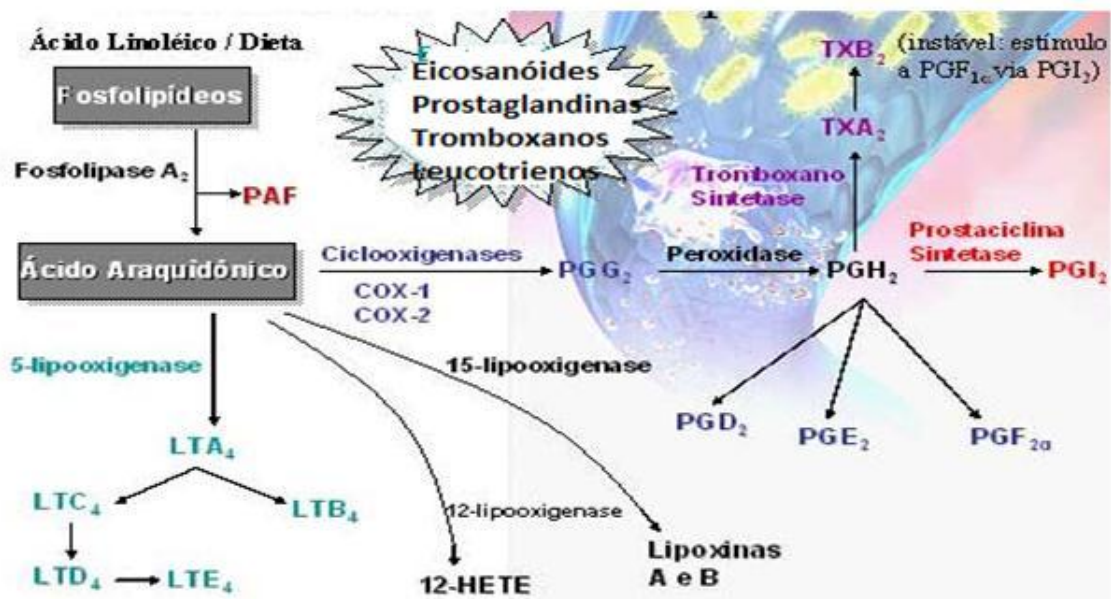
Os eicosanóides fazem parte de uma rede complexa de eventos fisiopatológicos, ao serem derivados de diferentes vias, podem apresentar atividade pró ou anti-inflamatória, dependendo do órgão e do estágio da doença, apresentando papel importante em eventos fisiológicos e a sua supressão tem sido um importante alvo terapêutico (YEDGAR et al., 2007) .

O AA livre é metabolizado por duas enzimas: a COX-1 e a COX -2. A COX-1 constitutiva, faz parte da constituição do trato gastrointestinal, sendo associada à produção de muco protetor e a inibição da secreção ácida gástrica, portanto, drogas que inibem essa enzima causam diversos distúrbios no trato digestivo. Nas plaquetas, a COX-1 está associada à síntese do tromboxano A₂, mediador que favorece a agregação e a adesão plaquetária, portanto, sua inibição está associada ao risco de sangramento cutâneo e gastrointestinal (STEAGALL et al., 2009). A COX-2 é indutível, está envolvida na síntese dos prostanóides, no desenvolvimento e progressão de processos inflamatórios. É induzida pelas citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, TNF- α , e outros mediadores nos sítios de inflamação como fatores

de crescimento e endotoxinas. As citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e a IL-13, assim como os glicocorticóides inibem a expressão de COX-2 (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

As COX-1 e 2 estão envolvidas na inflamação, onde o ácido araquidônico é transformado em prostaglandina G_2 (PGG_2) e subsequentemente em PGH_2 , sendo finalmente convertido por sintases específicas em PGs (prostaglandinas) como D_2 , E_2 e $F_{2\alpha}$ pela via COX-2, e por PGH_2 em tromboxano A_2 (TXA_2) (promove vasoconstrição e agregação plaquetária) e protaciclina (PGI_2) (potente inibidor plaquetário e vasodilatador) são produzidas pela via COX-1 e COX-2. Além da biossíntese de PGs e TX, também se inicia a biossíntese de leucotrienos (LT) feito pelas lipoxigenases (LOXs) também são vasoconstritores (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). As LOXs originam os LTs, o ácido hidroecossatetraenóico (HETE) e as lipoxinas. Os LTs são produzidos, predominantemente por células inflamatórias como leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos (Figura 4) (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Figura 4. Principais metabólitos envolvidos na cascata do ácido araquidônico. Figura retirada de <http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=11&materia_id=251&materiaver=1> visitado em 10 de janeiro de 2010.



Há ainda uma terceira isoforma da COX, isolada pela primeira vez no Sistema Nervoso Central do cão, chamada COX-3 e seria uma variante da COX-1. Essa

isoforma tem sido implicada, em parte, na analgesia central produzida pelos AINES e, principalmente, no efeito antipirético de algumas das subclasses (LEES et al., 2004; PAPICH, 2008). Diferencia-se da COX-1, pois tem menor atividade na biossíntese de PGs, sendo inibida, preferencialmente por anti-inflamatórios como acetaminofeno e dipirona, representando um possível alvo para a ação central apresentada por alguns AINES, diminuindo a dor e possivelmente a febre (PAPICH, 2008).

As prostaglandinas PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e TXA_2 , são os mais importantes na inflamação. A PGI_2 produzida na parede vascular possui ação vasodilatadora, além de potencializar os efeitos quimiotáticos, inibição da agregação plaquetária e de aumentar a permeabilidade de outros mediadores (KAM; SEE, 2000). As PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$ também são vasodilatadoras, mas possuem outras ações, as PGE_2 têm ação citoprotetora da mucosa gástrica, aumentam a atividade álgica da BK, estimulam a produção de esteróides pela supra-renal, liberando corticóides que participam da inflamação (LI et al., 2009).

As PGs são mediadas por dez tipos diferentes de receptores acoplados a proteína G (GONZÁLEZ-PÉRIZ; CLÀRIA, 2007). Com grande diversidade de receptores específicos e vários mecanismos reguladores, as PGs atuam como: protagonistas centrais na inflamação, dor, coagulação sanguínea, angiogênese, ovulação, parturição, metabolismo ósseo, crescimento e desenvolvimento neuronal, na cicatrização de lesão, na função renal, no tônus vascular e nas respostas imunes (KVATERNICK et al., 2007).

As lipoxigenases, presentes principalmente no citosol, são encontradas nos pulmões, plaquetas, mastócitos e leucócitos. A principal enzima do grupo é a 5 lipoxigenase, que atua sobre o ácido araquidônico produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5 HPETE), que é convertido em leucotrieno A_4 (LTA_4). O LTA_4 pode ser convertido em leucotrieno B_4 (LTB_4) ou, em uma série de cisteinil-leucotrienos, LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 . O LTB_4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (MURI; SPOSITO; METSAVAH, 2009), enquanto os cisteinil leucotrienos, principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos (BELCH; HILL, 2000).

O LTB_4 é um potente agente quimiotático que causa agregação dos leucócitos e também um importante agente responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, causa aderência, quimiotaxia e ativação de polimorfonucleares (neutrófilos,

eosinófilos e basófilos) e monócitos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e a produção de citocinas por essas células (GOODMAN et al., 2009). O LTB_4 tem sido reconhecido como fator importante em diversas doenças como dermatite, asma, doenças inflamatórias locais e sistêmicas, artrite reumatoide, psoríase e doenças cardiovasculares (NOGUCHI; OKUBO, 2011).

d) Óxido Nítrico (NO)

NO é um gás de radical livre formado numa reação catalisada por enzimas (óxido nítrico sintetase) entre o oxigênio molecular e a L-arginina (DUSSE; VIERA; CARVALHO, 2003). É produzido principalmente pelas células endoteliais do tecido lesionado, macrófagos e neurônios específicos, com potente ação vasodilatadora (relaxamento do endotélio), levando a um aumento da permeabilidade vascular e degradação de microorganismos. Age em células próximas ao local de sua produção (TRIPATHI; TRIPATHI; KASHYAP; SINGH, 2007).

As enzimas óxido nítrico sintetases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO. Existem três principais isoformas conhecidas da NOS: uma forma indutível (i-NOS), (expressa nos macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e em células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microorganismos invasores) e duas formas ditas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas nos endotélio (e-NOS) e neurônios (n-NOS) (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011).

O NO ativa a COX-1 na fase inicial de inflamação induzida por Cg e regula COX-2 na fase tardia na pele, resultando na produção de PGE_2 e PGI_2 no local da inflamação, as PGs induzidas no processo contribuem para a exacerbação do processo inflamatório (COUTINHO et al., 2009).

Dentre as suas principais ações no processo inflamatório encontram-se a vasodilatação e os efeitos citotóxicos sobre patógenos. Algumas aplicações clínicas do NO incluem os agentes doadores de NO (p. ex., nitroprussiato) e o sildenafil que potencializa as ações do NO no músculo liso dos corpos cavernosos e é utilizado no tratamento da disfunção erétil. A inibição da biossíntese do NO (p. ex., pela L-NMMA (N^G -monometil-L-arginina)) está sendo investigada em distúrbios caracterizados por produção excessiva de NO (p. ex., inflamação e doença neurodegenerativa) (DIAS; NEGRÃO; KRIEGER, 2011).

e) Citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, são produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteínases ativadas por mitógeno. Algumas citocinas podem ter ações pró ou anti-inflamatória de acordo com o microambiente no qual estão localizadas. As citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 e fator de necrose tumoral (TNF). As anti-inflamatórias são IL-4, IL-10, IL-13 e fator transformador de crescimento β (FTC β) (OLIVEIRA et al., 2011).

Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto à função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numerada sequencialmente de IL-1 a IL-35), TNF, quimiocinas (citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas possuem papel essencial na formação dos sinais locais ou sistêmicos de inflamação, são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos e liberadas por vários tipos de células em resposta a uma variedade de estímulos (vírus, parasitas, bactérias ou, em resposta a outras citocinas). Tem como função regular a ação das células destes sistemas na transmissão de sinais para a proliferação, diferenciação e função de várias células alvos (OPAL; DEPALO, 2000). Na fase inicial da resposta inflamatória (trauma tissular) podemos encontrar citocinas como: o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) que por sua vez, induz a liberação de outras citocinas, podendo se destacar a interleucina 1-Beta (IL-1 β), a interleucina 8 (IL -8) e a interleucina 6 (IL -6) (VERRI et al., 2006).

A IL-1 β é produzida principalmente por monócitos, macrófagos, linfócitos, mas também por neutrófilos e células dendríticas, e promove a proliferação e a diferenciação das células do sistema imune inato (resposta inflamatória) e adaptativo (antígeno-anticorpo). A IL-1 β estimula a expressão de COX-2 e, como consequência, a formação e liberação de prostanóides que têm importante papel na sensibilização dos nociceptores. Desta forma, indiretamente, a IL-1 β atua como mediador hipernociceptivo (OLIVEIRA et al., 2008).

Fatores como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular compõem a resposta imune inata. As células primárias da resposta imune inata são os macrófagos, células dendríticas, natural killer (NK) e neutrófilos. Proteínas do complemento, reagentes de fase aguda e a cascata da coagulação,

também têm importante papel na imunidade inata (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). A magnitude da resposta imune inata é determinada por mediadores da inflamação como citocinas e não citocinas. Por exemplo, o interferon- γ (IFN- γ) causa ativação de macrófagos e indução de formação de anticorpos e estimula diferenciação de células T-*helper*-I (Th I) em células T. Outro clássico exemplo é do TNF- α e IL-1(pró-inflamatória) que tem ação vasodilatadora e induz respostas sistêmicas de fase aguda. Ambas as citocinas tem capacidade de induzir febre, estimulam a produção de proteínas de fase aguda e causam ativação da célula endotelial (VERRI et al., 2006).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida principalmente por fagócitos mononucleares, mas pode ser produzida por outras células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, células NK e mastócitos) ou não inflamatórias (endotélio) em resposta a diferentes estímulos. Esta proteína interage com dois diferentes receptores externos TNFR1 (receptor de TNF, tipo 1) e TNFR2 (receptor de TNF, tipo 2). A ligação do mediador ao TNFR1 garante principalmente a migração de neutrófilos, o choque induzido por endotoxinas e a dor neuropática após lesão do nervo, enquanto que a ligação ao TNFR2 influencia a apoptose celular e necrose (MAZZON; CUZZOCREA, 2007).

A IL-6 é considerada como um mediador fundamental em diversas etapas da inflamação, estando envolvida principalmente na regulação das respostas inflamatória e imune. Dentre os vários efeitos pró-inflamatórios que lhe são atribuídos, está intimamente relacionada ao processo de reparo, na etapa mais tardia, na indução mitótica de queratinócitos e na fase mais precoce, e os seus efeitos quimioatrativos sobre neutrófilos (BALBINO et al., 2005).

f) Fator de ativação plaquetária: PAF

É formado por plaquetas, basófilos, neutrófilos e macrófagos. Sendo assim, o PAF é um fosfolípido que regula a liberação de citocinas amplificando a resposta inflamatória, aumenta a permeabilidade vascular por contração das células endoteliais, estimula a agregação plaquetária além de estimular as enzimas lisossômicas para produção de superóxidos, estimula a produção de collagenases e um potente quimiotático de eosinófilos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; WITZENRATH, et al., 2007).

g) Proteases plasmáticas:

- **Sistema complemento**

É formado pela via clássica, ativada por complexos imunes (é a mais rápida) e, pela via alternativa, ativada por compostos bacterianos (como por exemplo: LPS, mais lenta). Os principais elementos envolvidos na resposta inflamatória são o C3a, C4a e C5a. Conhecidos também como anafilatoxinas, estes fatores promovem aumento da permeabilidade vascular, estimulam os mastócitos a liberarem His que dilata as artérias locais, ativam neutrófilos, estimulam a síntese de prostaglandinas e leucotrienos e promovem opsonização (marcação de uma célula para ser fagocitada), uma de suas características mais importantes (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

- **Sistema de coagulação**

A inflamação e a coagulação estão intimamente ligadas, a cascata da coagulação é ativada durante lesão tecidual ou durante infecções.

Apresenta-se em duas vias intrínseca (via da ativação de contato que é ativada por trauma tecidual direto) e extrínseca (via do fator tissular que é iniciada por produção de fator tecidual) causando ativação da trombina a partir de protrombina, a trombina promove adesão dos leucócitos ao endotélio e a formação de fibrina a partir do fibrinogênio (RIEWALD; RUF, 2003).

Quando as plaquetas são ativadas, essas liberam produtos de oxidação do ácido araquidônico pela via COX (PGH₂ e TX), PAF, TNF- α , IL-1, IL-6, proteína C reativa e monócitos ativados que produzem fator tecidual. A presença do fator tecidual também conhecido como tromboplastina causa ativação do fator VII que então forma um complexo que em última instância causa formação de trombina (CARRAWAY; WELTY-WOLF; MILLER, 2003).

- **Sistema da cininas**

Estão envolvidas em uma série de eventos biológicos, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, modulação da dor, contração/relaxamento da musculatura lisa e efeitos na proliferação celular, além disso, acredita-se que as cininas também estão envolvidas na maioria dos estados patológicos da inflamação tais como asma, alergia, artrite reumatóide, choque endotóxico e pancreatite (CALIXTO et al., 2004).

A BK é um dos principais representantes desta classe de mediadores, é um nonapeptídeo clivado do cininogênio por uma enzima proteolítica, a calicreína.

Existem dois subtipos principais de receptores de BK: B₂, constitutivamente presente e o B₁, que é induzido na presença de inflamação. Existem antagonistas competitivos seletivos para os receptores B₁ (des-Arg Hoe 140) e para os receptores B₂ (icatibant) (BAWOLAK et al., 2006; SHIRASAKI; KANAIZUMI; HIMI, 2009).

Todo esse evento é dinâmico, culminando na resolução o que caracteriza o processo agudo. Entretanto, em certas ocasiões o processo se perpetua passando a inflamação a deixar de ser um processo de proteção, mudando para agressão ao organismo como acontece com doenças inflamatórias autoimunes.

3.3 Dor: aspectos gerais

A dor é um processo biológico essencial para a vida. É um mecanismo utilizado pelo organismo como alerta sobre a presença de um estímulo nocivo. Ela nos ensina a evitar situações danosas, desencadeando reflexos para que ocorra a retirada do corpo ou parte dele para longe do estímulo nocivo, além de induzir a manter em repouso regiões lesionadas (VANDERAH, 2007; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009). Reforçando a importância do processo doloroso em si, a dor, é uma sensação fundamental para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. Porém, quando persistente provoca sofrimento e reações emocionais negativas (ansiedade e depressão), reduzindo a qualidade de vida do indivíduo (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Em 2007 a dor foi conceituada, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e/ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Portanto a dor possui um caráter fisiológico e outro subjetivo/psicológico (LOESER; TREEDE, 2008). Pelo próprio conceito do processo doloroso, percebem-se dois componentes fundamentais: o componente emocional e o componente nociceptivo, também chamado fisiológico.

A dor pode ser classificada de acordo com vários critérios, como duração, topografia, intensidade, dentre outros. De acordo com os critérios temporais ela pode ser transitória, aguda ou crônica (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007).

A dor aguda geralmente é descrita como um sendo uma resposta normal e fisiológica a alguma forma de estímulo nociceptivo, com consequente ativação dos nociceptores. É inclusive descrita como reação saudável do organismo, permitindo

identificar um desequilíbrio homeostático, indicando que alguma atitude deve ser tomada em relação à fonte geradora de estímulos. Caracterizada por ser de curta duração, desaparecendo após a lesão, tem causa e localização definida. Na dor transitória a ativação dos nociceptores acontece independente da existência ou não de qualquer dano tecidual, sendo este tipo de dor responsável pela proteção do organismo frente a possíveis danos físicos oriundos de estresse tecidual ou mesmo ambiental (MEYR; STEINBERG, 2008).

A dor crônica pode ser definida, como uma dor sem estímulo contínuo ou patologia definida que dura mais do que o período normal de cura e recuperação (MEYR; SAFFRAN, 2008). Ela é tipicamente de origem inflamatória ou neuropática, sendo caracterizada pelo aumento da percepção dolorosa a um estímulo nociceptivo (hiperalgesia) e pela percepção alterada de estímulos que habitualmente não causam dor, como um leve toque (alodinia) (VANDERAH, 2007).

Do ponto de vista fisiológico a dor pode ser classificada em três tipos distintos: nociceptiva, inflamatória e neuropática (SALTER, 2005). A dor nociceptiva é um sistema de alerta fisiológico de proteção, essencial para detectar e minimizar o contato com os estímulos nocivos. A dor inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. A dor inflamatória aguda (declarada) resultada da ação de um estímulo desencadeante (térmico, químico ou mecânico) que ativa esses neurônios periféricos sensibilizados (RIBEIRO et al., 2000; DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Essas modificações funcionais da excitabilidade neuronal são induzidas por mediadores inflamatórios, liberados diretamente pelas células danificadas pelo trauma tecidual ou pelo reconhecimento de um elemento estranho ao organismo pelas células residentes, como por exemplo, os macrófagos. Dessa forma quando se refere atualmente aos nociceptores, não apenas se refere às suas extremidades periféricas, mas sim a fibra neural inteira, pois a hipernocicepção é um fenômeno que envolve todo o neurônio sensorial (FERREIRA et al., 2002).

Dor neuropática é definida como dor resultante de lesão primária ou disfunção do sistema nervoso central e periférico (HANSSON, 2005). A dor neuropática pode ser provocada por quaisquer lesões nas raízes e nervos periféricos, na medula espinhal, no tronco cerebral e no encéfalo. Os sinais e sintomas podem flutuar em intensidade com o tempo, suas principais características são a presença de dor

espontânea ou dor provocada por estímulos não nocivos nos locais afetados, combinação paradoxal de perda sensitiva e hiperalgesia na área dolorosa, dor paroxística e aumento gradual da dor com a estimulação repetitiva (NOGUCHI; OKUBO, 2011).

O componente fisiológico da dor é denominado nocicepção, que consiste na recepção dos estímulos nocivos pelos nociceptores. Os nociceptores são estruturas especializadas localizadas nas terminações dos neurônios sensoriais primários – que codificam e conduzem os sinais do estímulo nocivo aos centros superiores do SNC, onde ocorrerá a interpretação consciente da dor (LOESER; TREEDE, 2008). Assim, indivíduos podem ter o mesmo estímulo nociceptivo, contudo, a dor pode ser diferente, dependendo do contexto em que o mesmo se encontra (TRACEY et al., 2002).

Os nociceptores estão associados a dois tipos de fibras sensoriais, as quais propagam o sinal com velocidades diferentes devido à presença ou não de mielina em seus axônios. Uma delas é do tipo C, a qual não é mielinizada e responde a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química e por este motivo são denominados de nociceptores polimodais, sendo responsáveis pela sensação dolorosa tardia (MARCHAND, 2008).

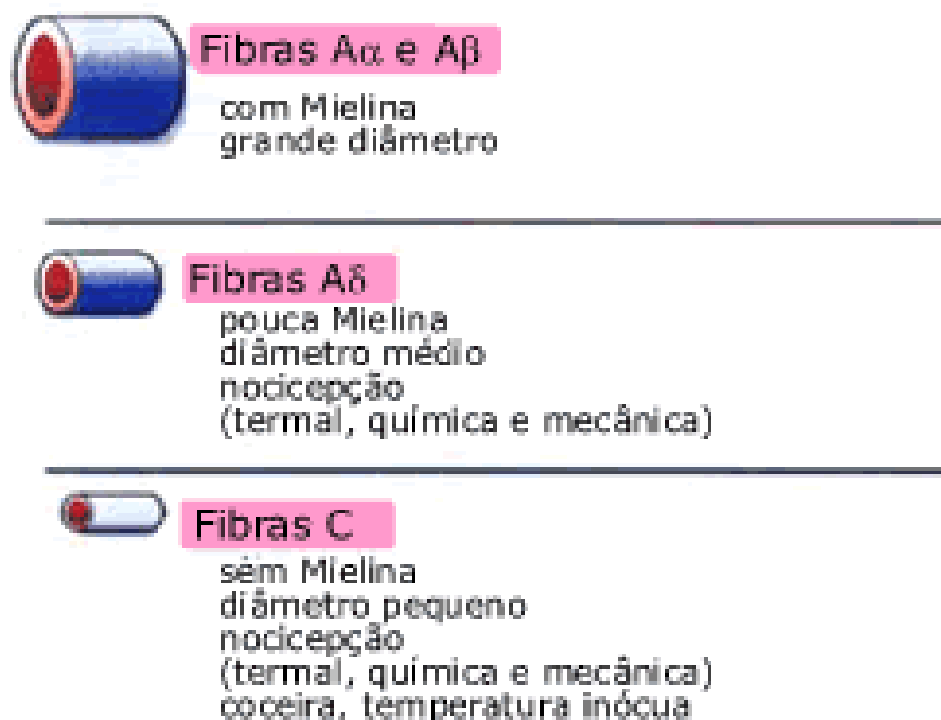
Outra fibra sensorial diretamente relacionada à nocicepção é a A δ , ela possui pouca mielina e propaga o sinal de forma mais rápida que a fibra do tipo C. São divididas em mecanonociceptores (sensíveis a estímulos mecânicos intensos e potencialmente danosos) e em polimodais (sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos e químicos) sendo responsáveis pela primeira sensação dolorosa. As fibras A δ se dividem em tipo I e tipo II. As fibras do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas em torno de 53 °C, enquanto que as fibras do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C (COUTAUX et al., 2005; VANDERAH, 2007).

Além das fibras acima descritas, as fibras A β são mielinizadas e de alto calibre, estão principalmente ligadas à condução de estímulos não-nociceptivos, como vibração e movimento (Figura 5) (VANDERAH, 2007).

A característica da resposta dos nociceptores a diferentes temperaturas passou a ser mais bem compreendida após a clonagem do receptor de potencial transitório vanilóide 1 (TRPV1). Em resposta a agonistas exógenos como a capsaicina (princípio ativo extraído da pimenta), o receptor TRPV1 abre o poro do

canal, que é permeável ao sódio e ao cálcio e provoca a despolarização de fibras nociceptivas do tipo C e A δ do tipo II (BELMONTE; VIANA, 2008). Além disso, estímulos nocivos térmicos em torno de 47°C ativam as mesmas fibras que expressam o receptor TRPV1, o que demonstra sua possível participação na percepção ao calor nocivo (SCHUMACHER, 2010). A estimulação do receptor TRPV1 em resposta ao calor também pode ser potencializada por substâncias liberadas no processo inflamatório, como prótons e a anandamida, além de outros mediadores que ativam a via da proteína quinase C (PKC) a qual pode sensibilizar o receptor TRPV1 tornando-o mais facilmente responsivo (CORTRIGHT; KRAUSE; BROOM, 2007).

Figura 5. Representação esquemática dos diferentes tipos de nociceptores primários (fibras A α , A β , A δ e do tipo C). Retirado de http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/dor/o_que_eh_dor.htm, acessado em 14 de outubro de 2011.

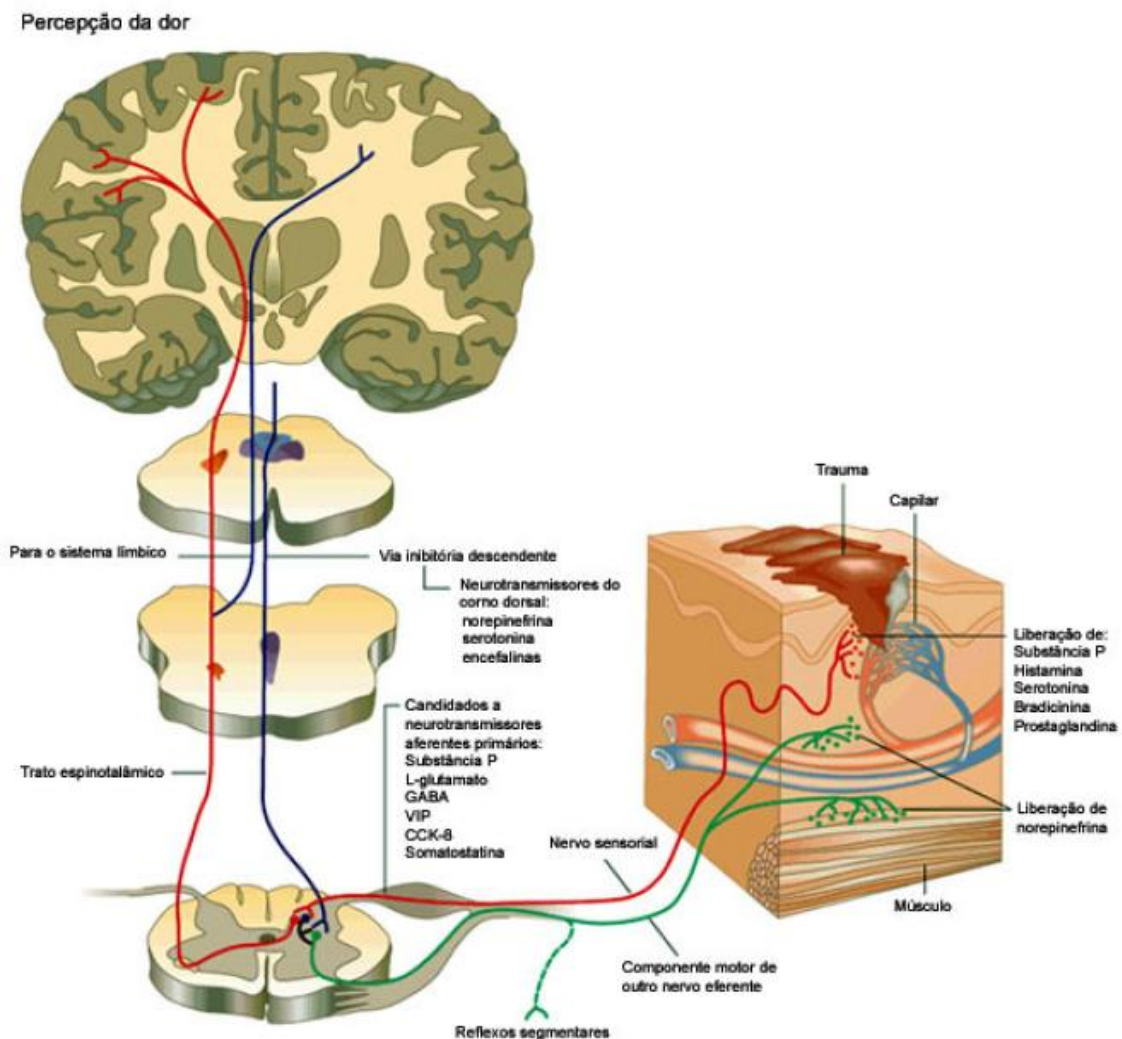


Vias de transmissão da Nocicepção

O potencial de ação gerado na periferia frente a estímulos nocivos é propagado nos neurônios nociceptivos principalmente pela ação de canais de sódio, cálcio e potássio dependentes de voltagem (XIE et al., 2005). Os neurônios de

primeira ordem emitem projeções para a medula espinhal, mais especificamente na região do corno dorsal, onde fazem sinapses com neurônios de segunda ordem que formam as vias ascendentes. Os neurônios de segunda ordem, ou de projeção cruzam a medula espinhal para ascender por diferentes tratos, como os espinotalâmicos, trigeminal, espinoparabraquial e espinomesencefálico, projetando seus corpos celulares ao tálamo. A via espinotalâmica é a mais estudada a respeito da transmissão do sinal nociceptivo (Figura 6) (ALMEDIA, ROIZENBLATT; TUFIC, 2004; VANDERAH, 2007).

Figura 6. Mecanismos de transmissão e percepção da dor. Diagrama esquemático mostrando o corno dorsal da medula espinhal que recebe as informações sensoriais oriundas das terminações periféricas de fibras nervosas nociceptivas ascendentes (cor vermelha) e descendentes (cor azul). Adaptado de (ALMEDIA, ROIZENBLATT; TUFIC, 2004).



No tálamo os neurônios de terceira ordem emitem axônios, através da capsula interna do córtex somatosensorial desencadeiam a somatização do estímulo nocivo, responsável pelo componente emocional da dor (CRAIG, 2003). O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias nociceptivas, sendo que o tálamo é um dos responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva, e o córtex é responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por identificar de forma pouco fiel de onde provém (MARCHAND, 2008).

Existe a modulação descendente da nocicepção. As vias descendentes se originam no tronco cerebral e outras estruturas como hipotálamo, córtex, tálamo, núcleo magno da rafe (NMR), substância cinzenta periaquedutal (PAG) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem importante papel na integração e modulação dos mensageiros nociceptivos, no corno dorsal da medula espinhal (OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010). Os mecanismos descendentes modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas vias aferentes primárias, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, interneurônios excitatórios e inibitórios e neurônios de projeção (PORRECA; OSSIPOV; GEBHART, 2002).

Medidores Envolvidos no Processo Nociceptivo

Diversos mediadores inflamatórios e/ou nociceptivos, quando liberados por macrófagos, mastócitos e células endoteliais promovem a despolarização das fibras nervosas tipos A e C. Estas irão conduzir impulso doloroso, iniciado em tecidos diferentes, facilitando assim a transmissão e as alterações inflamatórias periféricas (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006). De maior destaque podemos encontrar a acetilcolina (ACh), a SP, as cininas (bradicinina- BK), os leucotrienos, PAF, as PGs, o tromboxano, as citocinas, a His, 5-HT, trifosfato de adenosina (ATP), fatores de crescimento neuronal (NGF), entre outros (SAWYNOK, 2003; BASBAUM et al., 2009).

A sensação dolorosa provocada por estimulação térmica, mecânica, pode ser modulada, se no local estiver sendo liberados mediadores do processo inflamatório. De fato, muitos mediadores pró-inflamatórios interagem com seus receptores presentes em nociceptores, causando tanto sensibilização, quanto ativação destes neurônios nociceptivos (JULIUS; BASBAUM, 2001). Além disso, quando esses mediadores são administrados intradermicamente podem induzir reações

nociceptivas, através da ativação direta do nociceptor ou por sensibilizar este neurônio para outros diferentes estímulos, como térmico e/ou mecânico (DUBIN; PATAPOUTIAN, 2010).

Uma lesão tecidual ou inflamação resulta na ativação de várias substâncias, como a enzima proteolítica calicreína. Esta enzima degrada um peptídeo circulante chamado cininogênio que, por sua vez da origem a calidina, que é assim convertida em BK. A maioria dos efeitos apresentados pelas cininas é mediada pela ativação de dois tipos de receptores ligados a proteína G, o receptor B₁ e o receptor B₂. Os receptores B₂ são constitutivos e amplamente expressos no sistema nervoso central e periférico, e são importantes para o efeito fisiológico das cininas. Com algumas exceções, o receptor B₁ não é constitutivamente presente no tecido normal, mas sua expressão ocorre rapidamente em certas condições patológicas ou em condições inflamatórias. A BK é conhecida como um poderoso agente álgico (ROCHA et al., 2007).

A BK e as PGs causam alterações em receptores específicos (TRPV1), acoplados a canais iônicos ligante-dependente via ativação da adenosina-monofosfato cíclico (AMPC), e das proteínas cinases A (PKA) e C (PKC), reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa (ROCHA et al., 2007; BASBAUM et al., 2009).

Como já descrito anteriormente, no processo inflamatório são produzidos e liberados vários mediadores, como os prostanóides. Dentre os vários prostanóides sintetizados pela ação das enzimas COX, podemos destacar dois deles, a PGE₂ e a PGI₂. Eles são grandes contribuintes da hiperalgesia em processos inflamatórios (ROCHA et al., 2007). Embora, a aplicação de PGE₂ e PGI₂ na pele geralmente não seja dolorosa, elas promovem a sensibilização do nociceptor, principalmente através do aumento da condutância de canais de cátions sensíveis à voltagem, além de aumentar a liberação de neuropeptídeos provenientes das fibras C nos terminais periféricos. A PGE₂ provoca diminuição do limiar de excitabilidade dos nociceptores (MA, 2010).

A 5-HT, como outros neurotransmissores, também é liberada em resposta ao dano tecidual e inflamação, sendo proveniente principalmente de plaquetas, mastócitos e células endoteliais, bem como de terminais serotoninérgicos centrais e ajuda na sensibilização e ativação dos neurônios nociceptivos. A administração de 5-HT na pele causa dor em humanos através da excitação das fibras C e Aδ, e

parece ocorrer principalmente pela ligação da serotonina com os receptores do tipo 5-HT₃. Os receptores 5-HT₃ são canais iônicos permeáveis ao sódio e ao potássio, e sua abertura permite o influxo de cargas positivas para o interior do neurônio, culminando na geração do potencial de ação rumo ao corno dorsal da medula espinhal (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Outros mediadores, como o ATP, também são liberados após um dano tecidual. Ele provoca rápida despolarização de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, refletindo em grande entrada de cátions na célula (JENSEN; BARON, 2003). Além disso, células inflamatórias, plaquetas, células endoteliais, células de Schwann e os próprios terminais periféricos e centrais ajudam na liberação local de outros mediadores químicos, como neuropeptídios, SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o NO, neurotrofinas, His, prótons, citocinas, somatostatina, ACh, os aminoácidos excitatórios, como glutamato (Glu), entre outros. Esses mediadores interagem com receptores específicos levando a sensibilização ou ativação direta do nociceptor (GRIFFIS; COMPTON; DOERING, 2006).

Outros mediadores inflamatórios, como a BK, SP e as PGs, não atuam diretamente em canais iônicos, e sim em receptores acoplados a proteína G, podendo causar tanto ativação, quanto sensibilização nos nociceptores. De fato, muitos mediadores inflamatórios ao estimular os receptores acoplados à proteína G acabam ativando várias vias intracelulares, principalmente por atuarem através da proteína quinase C (PKC) ou através da proteína quinase A (PKA) acarretando em complexos sinais intracelulares (COUTAUX et al., 2005; ROCHA et al., 2007).

Muitas substâncias produzidas e liberadas frente à lesão tecidual, como a BK e a SP se ligam a receptores acoplados a proteína G_q e estimulam à atividade da fosfolipase C β (PLC β), esta enzima, degrada o fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP₂), gerando dois produtos, o inositol trifosfato (IP₃) e o diacilglicerol (DAG). O IP₃ é hidrossolúvel e se encontra no citoplasma celular, onde se liga a receptores no retículo endoplasmático e provoca a liberação de cálcio no interior de célula. O DAG é hidrofóbico e fica ancorado na membrana da célula, e juntamente com o cálcio liberado ativam alguns membros da família da PKC (VELAZQUEZ et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que a ativação da PKC, pode sensibilizar e despolarizar neurônios aferentes não mielinizados, principalmente por aumentar as correntes excitatórias ativadas por estímulos térmicos nocivos (ROCHA et al.,

2007).). Além disso, inibidores da PKC podem bloquear a sensibilização desses aferentes. Com o desenvolvimento de animais deficientes de proteína quinase C ϵ (PKC ϵ) e a utilização de inibidores dessa PKC foi demonstrado seu papel fundamental na nocicepção. A PKC ϵ possivelmente modula a via nociceptiva por fosforilar os receptores do tipo TRPV1, deixando-os sensíveis a estímulos nocivos de origem térmica e química (HWANG et al., 2000; TOMINAGA, 2007). Além disso, tem sido relatado que a PKC α também pode provocar ativação dos nociceptores por atuar em receptores do tipo TRPV1 (VELAZQUEZ et al., 2007).

3.4 Tratamentos farmacológicos da inflamação e da dor

Uma vez que a dor é um dos sinais cardinais do processo inflamatório, fármacos que interferem na inflamação, especificamente na resolução da mesma também podem ser eficazes no alívio da dor. Neste contexto os AINES e os glicocorticoides são classes que cumprem esse papel.

3.4.1 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

Os AINES são os medicamentos mais comumente usados para reduzir a dor e inflamação resultantes de diversos tipos de lesões. São fármacos que inibem a produção de mediadores da inflamação. Apesar de serem muito utilizados para o tratamento de desordens inflamatórias agudas, esses fármacos convencionais não tem tido êxito em curar desordens inflamatórias crônicas, como por exemplo, a artrite reumatoide e aterosclerose (LANGFORD, 2006).

Os AINEs são os mais utilizados e são potentes inibidores de COXs, consequentemente inibindo a síntese dos endoperóxidos cíclicos e das prostaglandinas. Possuem três ações principais farmacologicamente desejáveis:

- o efeito analgésico diminuindo a síntese de prostaglandinas; que significa menor sensibilização das terminações nervosas nociceptivas aos mediadores da inflamação, como a bradicinina e 5-HT;
- o efeito antitérmico deve-se, em parte, à diminuição de prostaglandinas produzidas em resposta ao pirógeno inflamatório, e a IL-1, que é responsável

pela elevação do ponto de ajuste hipotalâmico para o controle da temperatura, causando febre;

- e ação anti-inflamatória deve-se a redução das prostaglandinas vasodilatadoras (PGE_2 , PGI_2) e mediadores envolvidos direta e indiretamente, com a redução do edema, rubor e calor (BURIAN; GEISLINGER, 2005; MURI; SPOSITO; METSAVAH, 2009).

Os AINEs possuem várias classes como:

- Derivados do ácido salicílico: Ácido salicílico e salicilato de metila; Ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]);
- Derivado do ácido enólico: Piroxicam (Feldene[®]), tenoxicam (Tilatil[®]) e meloxicam (Meloxil[®]);
- Derivados do ácido fenilacético: Diclofenaco de sódio (Voltaren[®]) e de potássio (Cataflam[®]);
- Derivados do ácido fenilantonílico: Ácido mefenâmico (Ponstan[®]), ácido flufenâmico (Mobilisin[®]), ácido meclofenâmico;
- Derivado do ácido indolacético: Indometacina (Indocin[®]) e sulindaco;
- Derivados do ácido propiônico: Naproxeno (Flanax[®]), ibuprofeno (Advil[®]) e cetoprofeno (Profenid[®]);
- Derivados do para-aminofenol: Paracetamol (acetaminofeno) (Tylenol[®]) e fenacetina;
- Derivados da pirazolona: Fenilbutazona (Butazolidina[®]), dipirona (Novalgina[®]), oxifenilbutazona (Tandrex[®]), feprazona (Zepelan[®]) e aminopirina.

Entretanto os fármacos mais utilizados são: o ácido salicílico e ácido acetilsalicílico (AAS[®]). A aspirina é o fármaco mais utilizado como anti-inflamatório, analgésico e antipirético, protótipo da classe introduzida na medicina em 1899. O fármaco acetila irreversivelmente a COX-1 (MONTEIRO et al., 2008).

O fato de que a isoforma 1 da COX é a forma mais presente constitutivamente, leva a crer que a sua inibição pelos AINES não seletivos seja a base dos efeitos adversos graves observados com esses inibidores, principalmente sobre o trato gastrointestinal. Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2 está envolvida na estratégia terapêutica de escolha para o tratamento de condições inflamatórias (ALWANI et al., 2006). A COX-2 possui um canal para a entrada do

substrato, mais largo que a COX-1, desta forma, agentes seletivos para a COX-2 normalmente são moléculas maiores e volumosas que os não seletivos, grandes o suficiente para não conseguirem entrar pelo canal da COX-1 e impedir a entrada do AA (HAWKEY, 2001; MURI; SPOSITO; METSAVAH, 2009). A expressão da COX-2 é induzida por estimulantes inflamatórios como o lipopolissacarídeo de bactérias gram negativas (LPS), citocinas pro inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α) e fatores de crescimento, enquanto que sua expressão é inibida por glicocorticóides e citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) (MARQUES; CIZZA; STERNBERG, 2007).

Os primeiros fármacos de inibição seletiva de COX-2 surgiram na década de 1980 (meloxicam e nimesulida (Nisulid[®])), e os valdecoxib (Bextra[®]), etoricoxib (Arcoxia[®]), lumiracoxib (Prexige[®]) e o celecoxibe (celebra[®]) são fármacos mais recentes com inibição altamente seletiva da COX-2 e, portanto com menos efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal (MONTEIRO et al., 2008).

Contudo, também causam sérios efeitos adversos e os mais comuns são irritação no trato gastrointestinal, urticária e insuficiência renal aguda, o uso indiscriminado e prolongado dos AINES podem levar a outros efeitos como inibição da agregação plaquetária, nefrotoxicidade, dentre outros (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008).

3.4.2 GLICOCORTICOIDES

Glicocorticoides são mediadores anti-inflamatórios endógenos potentes, liberados em minutos, em resposta ao estresse e à lesão tecidual, para controlar a severidade da resposta inflamatória, funcionando como freios internos contra reações inflamatórias potencialmente exageradas produzidas pelo hospedeiro (SCHIMMER; PARKER, 2003; ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008).

Os glicocorticóides sintéticos agem da mesma forma que mediadores endógenos. Sua ação se dá através de receptores nucleares (GR), localizados sob a forma inativa no citoplasma. A ligação do glicocorticoide ao receptor o ativa e o complexo glicocorticoide-GR dirige-se para o núcleo, onde reage na forma de dímeros, com os elementos responsivos aos glicocorticoides (GRE), que são sequências específicas de DNA dentro das regiões reguladoras dos genes afetados. Esta ligação leva à ativação ou à inibição da transcrição de genes-alvo. Além da interação receptor-DNA, os glicocorticóides também parecem exercer sua ação

através de interações receptor-proteína, onde a proteína ligante consiste em importantes fatores de transcrição, como o fator nuclear kappa-B (NF-kB) e a proteína ativadora 1 do complexo dos fatores de transcrição (AP 1), quais regulam a expressão de diversos componentes do sistema imune. Dessa forma, há a inibição da produção de mediadores inflamatórios pelos leucócitos, bem como das respostas das células-alvo a estes mediadores (GILROY et al., 2004). Esse fato confere a essa classe de medicamentos não só a propriedade anti-inflamatória, como também a propriedade imunossupressora.

Os glicocorticoides também são conhecidos como anti-inflamatórios hormonais (esteroides). Estes são inibidores, ou seja, reduzem parcialmente ou totalmente a produção de prostaglandinas e leucotrienos pela ação inibitória sobre a enzima PLA₂. Possuem ação anti-inflamatória, imunossupressora e antialérgica (ANTI; GIORGI; CHAHADÉ, 2008). São observados principalmente com o uso sistêmico prolongado supressão da resposta à infecção ou lesão, supressão da síntese de glicocorticoides endógenos, síndrome de Cushing (caracterizada pelo aumento da gordura abdominal) e outros (LONGUI, 2007).

Os fármacos mais usados são: hidrocortisona (usados para substituição de cortisol), dexametasona (tem pouco efeito mineralocorticoide), prednisolona (primeira escolha na inflamação sistêmica), budesonida, fenilbutazona e beclometazona (usado na pele na forma (creme) e como aerossol na asma e rinite alérgica) (CARVALHO, 2004). Essa classe de agentes anti-inflamatórios está entre os fármacos mais usados na terapia de doenças crônicas como a asma e em parte, devido a supressão das citocinas através da inibição do potente fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB), proteína inibidora do NF-kB (IκB) e pela indução de apoptose de eosinófilos. O tratamento com glicocorticóides também é capaz de inibir citocinas pró-inflamatórias como a IL-2 e IL-12, o IFN-γ, as enzimas COX e PLA₂ (LONGUI, 2007).

Enfim, situações patológicas em que a resposta inflamatória se torna um fator de lesão, perda das funções normais do organismo e até mesmo um fator de risco de morte, possuem inúmeras alternativas terapêuticas. Contudo, tais alternativas mostram-se apenas paliativas, e/ou apresentam efeitos adversos que, muitas vezes, se sobrepõem às vantagens do tratamento. Desta forma, a busca por novas abordagens terapêuticas, e/ou tratamentos anti-inflamatórios com menos efeitos

adversos, é compreensivelmente constante e na maioria das vezes parte do uso popular de remédios caseiros, os quais necessitam de comprovação científica.

3.5 Cicatrização: aspectos gerais

A cicatrização das lesões é um processo altamente complexo. Nele existe uma sequência de estágios interdependentes e sobrepostos, tais como: inflamação, quimiotaxia, proliferação celular, diferenciação e remodelação, que são agrupados em três fases: fase da inflamação, fase da fibroplasia ou proliferativa e por último a fase da maturação ou remodelação (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Para que o tratamento da lesão tenha sucesso é necessário avaliar a lesão e os fatores que podem interferir no processo de cicatrização. O cuidado se inicia avaliando o paciente, após, deve ser realizado o debridamento e a limpeza da lesão (MENDONÇA et al., 2006).

O processo cicatricial fisiológico é iniciado com resposta inflamatória caracterizada pelo aumento de fluxo sanguíneo, permeabilidade capilar e migração de neutrófilos para a região lesada. A permeabilidade capilar promove extravasamento de plasma e seus componentes formando o exsudato inflamatório (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Inicialmente, a lesão é preenchida por coágulos, fibrinas e exsudato formando uma crosta que a isola do meio ambiente quase que imediatamente. Os neutrófilos e macrófagos são as primeiras células a migrarem para a região lesada em resposta do organismo à invasão bacteriana e ao fagocitarem as bactérias se degeneram formando o pus com os tecidos necróticos (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006; GROTE; SCHÜTT; SCHIEFFER, 2011)

O tecido de granulação é o novo tecido que cresce rico em colágeno para preencher a lesão ao se contrair, retrai as bordas da lesão de pele para o centro da mesma permitindo que a área a ser reepitelizada se torne menor. Quando o exsudato persiste na lesão, ocorre desagregação da crosta e favorece o desenvolvimento de germes, que fica entre a crosta e o tecido de granulação (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008).

As plaquetas, leucócitos polimorfonucleares, células endoteliais, mastócitos teciduais, basófilos, monócitos/macrófagos, bem como, o tecido lesado são fontes celulares de mediadores vasoativos. Estes podem estar pré-formados e

armazenados em grânulos citoplasmáticos a exemplo da His e da 5-HT. As PGs, LT, TX e o PAF são derivados do metabolismo dos fosfolipídeos ou do ácido araquidônico não estando pré-formados (RUBIN; FARBER, 2000)

3.5.1. Fases da cicatrização

3.5.1.1 Fase Inflamatória ou exsudativa (coagulação e inflamação)

Esta fase se inicia imediatamente após a lesão, tem duração 48 a 72 h com a liberação de substâncias vasoconstritoras, principalmente TXA_2 e PGs, pelas membranas celulares. O endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata da coagulação. As plaquetas têm papel fundamental na cicatrização. Visando a hemostasia, a cascata da coagulação é iniciada e grânulos são liberados das plaquetas, as quais contêm fator de crescimento de transformação beta ($TGF-\beta$) (controla a proliferação e a diferenciação celular) e também fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), PGs e TXs, que atraem neutrófilos à lesão (JORGE; DANTAS, 2005).

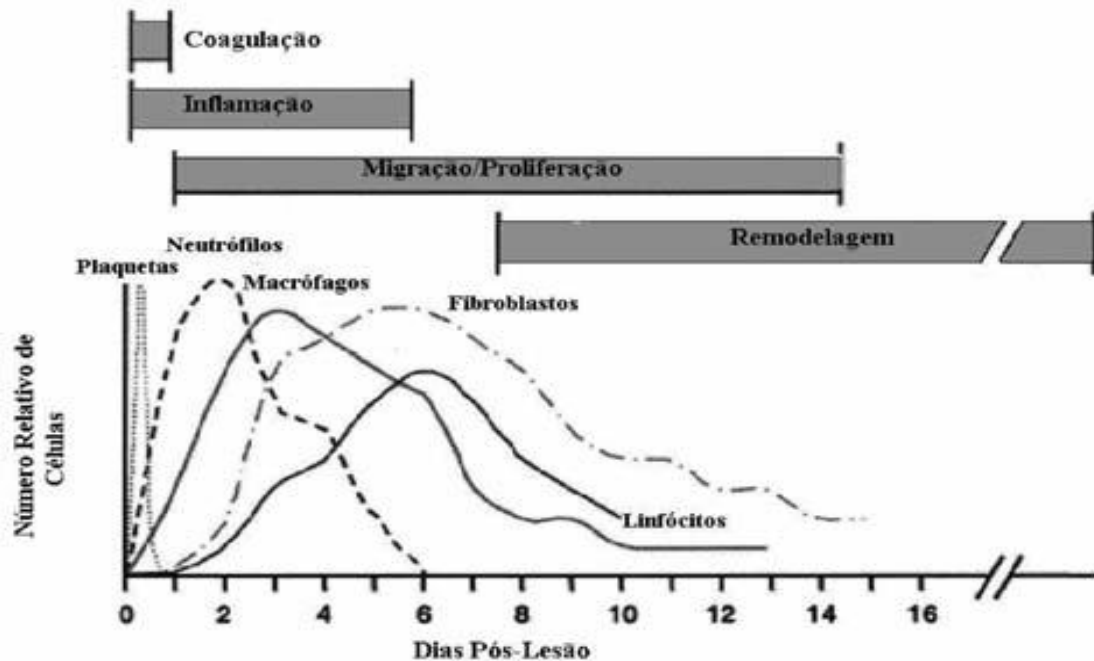
Um coágulo é então formado, constituído por colágeno, plaquetas e trombina, que servem de reservatório protéico para síntese de citocinas e fatores de crescimento, aumentando seus efeitos. Desta forma, a resposta inflamatória se inicia com vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia (migração de neutrófilos para a lesão) (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar no local da lesão, com maior concentração 24 horas após ter ocorrido o processo. São atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do endotélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana) e produzem radicais livres que auxiliam na destruição bacteriana durante o processo eles (neutrófilos) são gradativamente substituídos por macrófagos (MARTINS et al., 2006).

Os macrófagos migram para a ferida após 48-96 horas da lesão, e são as principais células antes dos fibroblastos migrarem e iniciarem a replicação. Têm papel fundamental no término do debridamento (é a remoção do tecido morto presente na lesão) iniciado pelos neutrófilos e sua maior contribuição é a secreção de citocinas e fatores de crescimento, além de contribuírem na angiogênese,

fibroplastia e síntese de matriz extracelular, fundamentais para a transição para a fase proliferativa (Figura 7) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Figura 7. Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização (MENDONÇA; NETO, 2009).



3.5.1.2 Fase Proliferativa ou reconstrução

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dito, compreende: reepitelização, que se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (JORGE; DANTAS, 2005).

A reepitelização é a fase precoce do processo cicatricial. Se a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram em direção superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas em três dias. Se a membrana basal for

lesada, as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar na tentativa de restabelecer a barreira protetora (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003). Ocorre migração dos queratinócitos não danificados das bordas das lesões e dos anexos epiteliais (espessura parcial). Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio. Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é também determinado pelo conteúdo de água no leito da ferida, dessa forma as lesões permanecem úmidas favorecendo o tecido de granulação deixando uma melhor cicatriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Cabe salientar que o aumento da permeabilidade microvascular é o primeiro estágio desse processo, apresentando-se como etapa importante, que permite, através do extravasamento de proteínas, citocinas e elementos celulares, a formação de matriz extracelular provisória necessária à migração e proliferação das células endoteliais (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A angiogênese é etapa fundamental do processo de cicatrização, na qual novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e supre de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento. A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação das células endoteliais. A indução da angiogênese é atribuída às moléculas identificadas, como angiogênicas, incluindo o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento transformação beta ($TGF-\beta$), angiogenina, angiotropina e angiopoetina-1 (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A parte final da fase proliferativa é a formação de tecido de granulação. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, porém precisam ser ativados para sair de seu estado de quiescência. O fator de crescimento mais importante na proliferação e ativação dos fibroblastos é o PDGF. Em seguida é liberado o $TGF-\beta$, que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a se transformarem em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Os principais fatores de crescimento envolvido no processo cicatricial estão citados no quadro 1.

Quadro 1. Principais fatores de crescimento envolvidos no processo cicatricial

Fator de Crescimento	Origem	Função
TNF-α	Monócitos e linfócitos	Proliferação de fibroblastos. Quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos
EGF-α	Matriz extracelular da ferida cirúrgica	Proliferação celular Estimula a epitelização
TGF-β	Plaquetas, matriz extracelular da ferida cirúrgica	Mitogênicos para fibroblastos Formação de tecido de granulação
PDGF	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Proliferação de fibroblastos e a produção de matriz extracelular.
VEGF	Queratinócitos e macrófagos	Angiogênese e a proliferação de células endoteliais
IL-1	Mononucleares	Proliferação de fibroblastos

Adaptado de BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006.

Nota: TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; EGF: fator de crescimento epidérmico; TGF- β : fator de crescimento de transformação beta; PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas; VEGF: fator de crescimento derivado do endotélio vascular; IL-1: interleucina 1.

3.5.1.3 Fase de Maturação ou modulação (contração da ferida ou remodelação)

A fase de maturação ou modulação é o processo que organiza a cicatriz, é a fase mais longa da cicatrização, tendo início em torno da terceira ou quarta semana após o dano tecidual e pode durar meses a anos dependendo do grau, extensão e local da lesão. Durante esse período permanece a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno, os quais comprimem os vasos, diminui a vascularização e a produção de matriz extracelular. É o retrocesso do tecido de granulação com aumento da força tênsil e reorientação das fibras de colágeno, ou seja, substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso e a recomposição celular da epiderme. A cicatriz assume coloração semelhante à pele adjacente (JORGE; DANTAS, 2005).

A collagenase, a gelatinase e outras enzimas hidrofílicas são secretadas pelos fibroblastos na lesão, e novas matrizes de proteínas são depositadas, resultando numa lesão cicatrizada. Os eosinófilos aparecem nas últimas fases da reparação e presumi-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento. Quando a ferida completou o seu fechamento e os microorganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas. Os linfócitos não somente são efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O conteúdo fibroso da cicatriz está relacionado à tensão que incide sobre as bordas, a qual age como elemento estimulador. A cicatriz continua evoluindo até aproximadamente um ano após a cirurgia. Normalmente logo após a retirada das suturas, apresenta-se fina e de coloração semelhante à pele do local. À medida que o tempo passa, em torno de 30 a 90 dias, pode se apresentar de coloração rosada, aumentar de volume e se tornar sintomática. Desse período até aproximadamente um ano de pós-operatório, regride gradativamente, atingindo um aspecto um pouco mais claro que a pele, plana e discretamente mais larga que no seu estado inicial. Além desses eventos, ocorre também a retração da cicatriz ao longo de seu comprimento, sendo máxima aos três meses, regredindo, parcial ou totalmente, após um ano de cirurgia. O epitélio que recobre a cicatriz é mais fino que o normal e não apresenta papilas dérmicas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Tipos de cicatrização

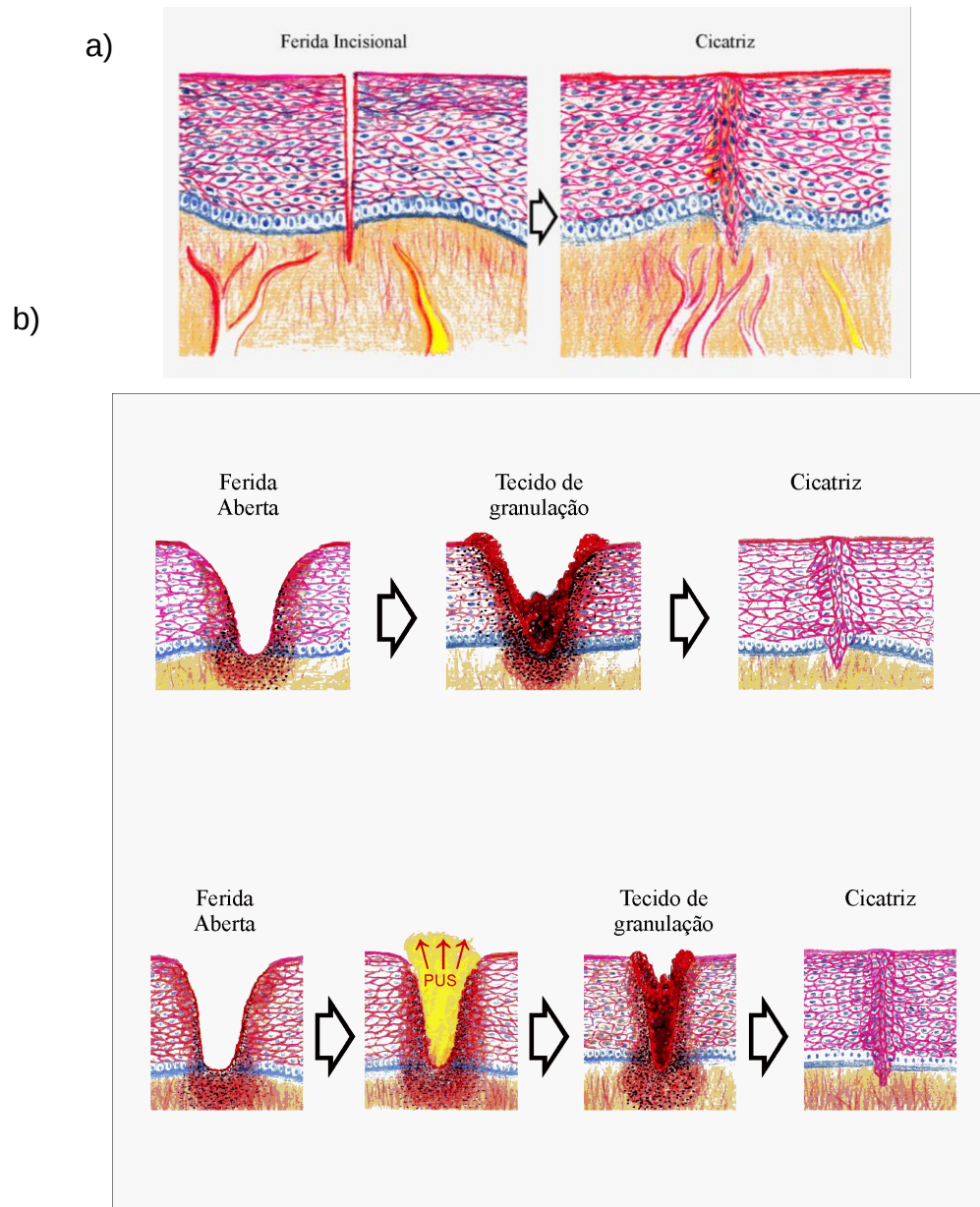
Jorge e Dantas (2005) descreveram o processo cicatricial de fechamento de ferida por primeira, segunda ou terceira intenção ou cicatrização primária, secundária e fechamento primário retardado, de acordo com a quantidade de tecido perdido, agentes causadores da lesão e conteúdo microbiano.

Na cicatrização por primeira intenção ocorre perda mínima de tecido, é possível fazer junção dos bordos da lesão, com redução do risco de infecção, sendo a situação ideal para o fechamento das lesões. Esse processo está associado a feridas limpas. A formação de tecido de granulação não é visível, e a cicatrização ocorre dentro do limite fisiológico esperado deixando cicatriz mínima (Figura 8).

A cicatrização por segunda intenção nas feridas ocorre com perda acentuada de tecido com a presença ou não de infecção. Não é possível a junção das bordas cicatriciais e, as feridas são deixadas abertas fechando-se por meio de contração e epitelização, com produção extensa de tecido de granulação e produção significativa de cicatrização (Figura 8).

Nas cicatrizes por terceira intenção inicialmente a ferida é também deixada aberta, por apresentarem sinais de infecção funcionando como cicatrização por segunda intenção. Após alguns dias de tratamento local, a ferida é fechada através de sutura, como cicatrização por primeira intenção. Esse procedimento é geralmente empregado nas feridas cirúrgicas com infecção (JORGE; DANTAS, 2005; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Figura 8. Formas da cicatrização: **a)** cicatrização por primeira intenção; **b)** cicatrização por segunda intenção. Retirado de <http://www.misodor.com/cicatrização.html>, acessado em 14 de outubro de 2011.



Segundo Silva e colaboradores (2007), há diversos fatores que retardam ou impedem o processo fisiológico na cicatrização, dentre eles pode-se destacar:

- a manutenção de pressão contínua sobre a área da lesão ou proeminência óssea a qual interrompe o suprimento sanguíneo para os tecidos;
- a manutenção da lesão em ambiente seco que retarda de três a cinco vezes a cicatrização;
- a presença de edemas que interferem no suprimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos;

- as condições nutricionais do paciente que diminuem a resposta imunológica; a presença de tecido desvitalizado ou necrótico; a idade que diminui a resposta inflamatória;
- a síntese de colágeno e a angiogênese;
- o uso de drogas sistêmicas e imunossupressoras que inibem a cicatrização e diminuem a resposta inflamatória aumentando a suscetibilidade às infecções;
- doenças como hipertensão, nefropatias, diabetes melito, neoplasias, problemas vasculares e hepatopatias que retardam ou impedem a evolução do processo cicatricial (JORGE; DANTAS, 2005; MARTINS, et al., 2006).
- Os fatores sistêmicos: idade, estado nutricional (mal nutridos tem dificuldades de formar cicatrizes, devido à ausência de proteínas e vitaminas que são importantes para a síntese de colágeno), isquemia tecidual (vai haver dificuldade em chegarem células inflamatórias, à zona lesada, logo vão existir menos fatores que estimulem à proliferação dos fibroblastos a síntese de colágeno), infecção (dano tecidual constante e reação inflamatória persistente), vascularização, medicamentos sistêmicos, doenças de base como diabetes, alterações cardiovasculares e de coagulação e uso de drogas sistêmicas;
- Os fatores locais: localização da lesão, tipo de tecido lesado, agentes tópicos, tecido necrótico, tempo de evolução e o tipo de cobertura (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007).

3.6 Fármacos cicatrizantes

Os produtos utilizados para terapêutica das feridas incluem agentes tópicos e curativos. Agentes tópicos são aqueles (ex. antissépticos) aplicados diretamente sobre o leito da ferida, destinados à limpeza e a proteção da área em seu redor. Esse processo é de fundamental importância para reparação dos tecidos, pois a cicatrização não evolui de maneira adequada enquanto não houver a remoção de detritos e corpos estranhos, microorganismos da superfície da lesão e do excesso de exsudatos e tecido necrótico (JORGE; DANTAS, 2005; SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007).

Os agentes curativos (cobertura) são recursos que cobrem uma ferida, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização e protegê-la contra a ação dos

agentes externos (físicos, mecânicos e biológicos) (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003; JORGE; DANTAS, 2005).

A terapia tópica e o tipo de cobertura a serem utilizados nas feridas dependem do grau de contaminação, natureza, localização, tamanho, fatores locais e sistêmicos relacionados ao processo de cicatrização e presença ou não de exsudatos (GEOVANINI; OLIVEIRA; PALERMO, 2007).

3.7 Algumas plantas medicinais com propriedades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante

Em nosso país temos uma vasta biodiversidade nas diversas regiões, possibilitando a população brasileira o uso da fitoterapia na terapêutica dos processos inflamatórios, dolorosos e/ou cicatrizante. Entretanto, o uso de plantas na terapêutica desses processos ainda ocorre, muitas vezes, de forma praticamente empírica. Só para termos uma ideia disso, de 35 espécies utilizadas no nordeste brasileiro, pela população, para um desses fins, ou para o tratamento de outras doenças, somente 12 delas tem comprovação científica através de ensaios pré-clínicos (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010). Diante disso, vários grupos de pesquisas brasileiros vêm se dedicando ao estudo de plantas medicinais.

No Brasil, somente em 2005, foi lançado o primeiro fitoterápico brasileiro em forma de creme o Acheflan® obtido da *Cordia verbenácea* ("Erva-Baleeira"), comercializado pelo laboratório ACHÉ. Sua ação foi atribuída aos seus constituintes sesquiterpenos o α -humuleno e trans-cariofileno (PASSOS et al., 2007).

Com relação à validação das propriedades farmacológicas de plantas medicinais, podemos descrever os estudos realizados com as seguintes plantas:

- *Eucalyptus sp.* Em 1967, Lysenko, evidenciou que o azuleno, extraído do óleo de *Eucalyptus sp.* possuía atividade anti-inflamatória.
- *Semecarpus anacardium* Linn. ("Ballataka") - Satyavati e colaboradores (1969), verificaram a atividade anti-inflamatória através de modelos de indução de inflamação por carragenina.
- *Casearia sylvestris* ("Guaçatonga") é utilizada na medicina popular da América do Sul por sua atividade antisséptica, cicatrizante, anestésica e anti-ulcera (BASILE et al., 1990). Borges e colaboradores (2000), verificaram que

o extrato bruto aquoso dessa planta inibia parcialmente a atividade de venenos contendo classe I, II e III de PLA₂.

- *Tabebuia avellanedae* (*pau d'arco*), Miranda e colaboradores (2001), estudaram o efeito antinociceptivo e antiedematogênico do extrato aquoso da casca através dos modelos experimentais de nocicepção em camundongos e edema de pata induzido por carragenina em ratos.
- *Chenopodium álbum*, Dai e colaboradores (2002), avaliaram o efeito antipruriginoso e antinociceptivo, em “comportamento de coçar” induzido por 5-HT, de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina.
- *Uncaria tomentosa* da família Rubiaceae, conhecida popularmente como “unha-de-gato”, Possui indicação para inflamação crônica, gastrite, úlcera gástrica e artrite reumatoide (PERAZZO, 2004). Há relatos de sua efetividade no tratamento de doenças inflamatórias como asma e artrite (CISNEROS; JAYO; NIEDZIELA, 2005; SETTY; SIGAL, 2005). O extrato da casca da *U. tomentosa* foi capaz de inibir a produção de TNF- α e PGE₂. Além disso, a planta exibiu atividade antioxidante e captadora de radicais livres (GONÇALVES; DINIS; BATISTA, 2005). Foi ainda verificado que a unha de gato pode proteger as células contra o estresse oxidativo por impedir a ativação do NF-kB (CISNEROS; JAYO; NIEDZIELA, 2005).
- *Nidularium procerum* (família Bromeliaceae) foi avaliada em modelos de pleuresia induzida por LPS, PAF e formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP). O extrato aquoso inibiu a migração de neutrófilos, produção de citocinas inflamatórias, como IL-I e IL-VI, de PGE₂ no modelo de pleurisia induzida por LPS (AMENDOEIRA et al., 2005).
- *Calendula officinalis* L, da família Asteraceae, tem seu uso medicinal registrado desde o século 12 como antipirético, anti-inflamatória e reguladora do ciclo menstrual (CARVALHO, 2004). Tópicamente é indicada para a cura de feridas, na forma de pomada ou unguento (NITZ, 2006), enquanto o chá é usado no tratamento de processos como conjuntivite, faringite e estomatite (CARVALHO, 2004). Dados publicados conferem sua atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica, produzida pelos triterpênicos presentes na planta (AKIHISA et al., 1996; NEUKIRCH et al., 2005). O ácido oleanólico

presente na planta favorece a regeneração de tecidos danificados e possui ação antisséptica. Já os flavonoides reforçam a ação cicatrizante e são úteis nas cólicas menstruais. (CARVALHO, 2004). A calêndula também exibe efeito antitumoral e citotóxico (UKIYA et al., 2006).

- *Zingiber officinale* Roscoe, família Zingiberaceae. Originária da Índia e Ásia Tropical e aclimatada no Brasil, usada mundialmente como importante especiaria e planta medicinal (SILVA; CARVALHO, 2004; ZHOU; DENG; XIE, 2006). A planta tem sido usada a milhares de anos na medicina Ayurveda e Sino-Japonesa, para inflamação e reumatismo. Estudos clínicos sugerem que o óleo de gengibre, pode ser usado na artrite e outras dores crônicas associadas à inflamação (ZHOU; DENG; XIE, 2006). Quanto ao mecanismo de ação, verificou-se a inibição da COX, da biossíntese de leucotrienos e de TNF- α (SETTY; SIGAL, 2005).
- *Mandevilla velutina* (“Jalapa”) - *Velutinol A*, isolado da planta reduziu parcialmente, cerca de 30%, o edema de pata de rato induzido por carragenina sem afetar os edemas induzidos por His, SP, PAF ou BK. (BIONDO et al., 2003; MATTOS et al., 2006).
- *Cissampelos sympodialis* (“orelha-de-onça”), Bezerra-Santos e colaboradores (2006) estudaram o efeito da planta através do modelo de asma e pleurisia alérgica em camundongos BALB/c sensibilizados, observando que o pré-tratamento oral com o extrato bruto reduziu o influxo de eosinófilos, recrutados por estímulo de alérgeno, de forma dose-dependente. *C. sympodialis* foi também capaz de inibir a formação de anticorpos e secreção de cisteinil leucotrienos. Verificou-se também que, um alcaloide denominado warifteina é o componente ativo da planta, por apresentar a mesma atividade biológica do extrato.
- *Bidens pilosa* L., (Picão) é popularmente usado para tratamento de inflamações, hepatite, icterícia neonatal, dismenorreia e diabetes, dentre outras indicações populares (CARVALHO, 2004; HORIUCHI; SEYAMA, 2006). Estudos comprovaram suas ações imunossupressora e anti-inflamatória, sendo esta última por inibir a produção de IgE e a liberação de His pelos mastócitos (PEREIRA et al., 1999). A planta possui flavonoides e derivados do ácido caféico, os quais exibem comprovada ação captadora de radicais livres (HORIUCHI; SEYAMA, 2006).

- *Alpinia zerumbet* é uma planta herbácea de grande porte usada como ornamental e medicinal em diferentes regiões do Brasil. O óleo essencial é rico em mono e sesquiterpenos, com maior concentração de cineol e terpineol, mas entre seus componentes fixos, os mais importantes são os flavonoides e as kava-pironas (LORENZI; MATOS, 2002). O extrato aquoso das folhas e o óleo essencial submetido a ensaio farmacológico mostraram ação anti-hipertensiva, diurética e antinociceptiva (OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010), o que é compatível com sua indicação popular para tratamento da hipertensão e dor.
- *Persea cordata* (Lauraceae) conhecida no sul do Brasil como “pau-andrade”, é popularmente muito utilizada como cicatrizante de feridas. Animais tratados com a pomada a base de cascas de *P. cordata* a 10% tiveram uma evolução cicatricial mais rápida que a do grupo controle apresentando uma ação mais pronunciada nos estágios iniciais do processo cicatricial e facilitando o processo de reepitelização (VIERA et al., 2001).
- *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira) - Lucena e colaboradores (2006) observaram que o extrato hidroalcoólico da aroeira possui efeito cicatrizante. Foi verificado que animais tratados com a planta tiveram um fechamento epitelial acelerado de lesões ulceradas em relação ao grupo controle, além de uma maior proliferação vascular e fibroblástica (RIBAS et al., 2006). Outro estudo, que avaliou o efeito cicatrizante da administração tópica do extrato hidroalcoólico de aroeira em feridas abertas na região dorso costal de ratos, concluiu que este extrato retardou a reepitelização das feridas da pele das cobaias (BRANCO NETO et al., 2006).
- *Triticum vulgare* (“Trigo”) pertencente à família Poaceae, estimula a mitose e motilidade dos fibroblastos, reduzindo o tempo de cicatrização das feridas. Em animais tratados com o extrato incorporado a um creme. O creme à base de *T.vulgare* intensificou a migração de células reparadoras ao local (polimorfonucleares) além de estimular a multiplicação dos fibroblastos e produção de colágeno, culminante na redução do tempo de cicatrização das feridas (SOUZA et al., 2006).

- *Aloe arborescens* (Babosa) - O sumo mucilaginoso de folhas possui atividade cicatrizante devido a presença de fitoconstituintes como o polissacarídeo aloeferon (SAITO et al., 1982).
- *Symphytum officinale* (“Confrei”) promove efeito cicatrizante devido à presença da alantoína (VARGAS et al., 2009).
- *Tabebeuia avellanadae* (O ipê- roxo) - é muito utilizado na medicina popular como cicatrizante. Além disso, tem ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica comprovada. Os princípios ativos principais por tais atividades são as quinonas, naftoquinona, taninos e flavonoides (COELHO et al., 2010).
- *Stryphnodendron barbatiman Martius* (barbatimão) uma leguminosa do cerrado brasileiro. As cascas apresentam efeito adstringente e contêm como princípios ativos o tanino, flobafenos e um glicídio solúvel. A sua ação cicatrizante de feridas e úlceras se deve a riqueza de taninos em sua composição (COELHO et al., 2010).
- *Coronopus dydimus*, conhecida popularmente como “mastruço” foi estudada por Busnardo e colaboradores (2010) foi analisado o efeito antiinflamatório do extrato hidroalcoólico das folhas através dos modelos experimentais de pleurisia e edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos (Cg, BK, SP, His, PGE₂, e Dextrana), o extrato hidroalcoólico reduziu a inflamação produzida por todos os agentes flogísticos.

Embora, tenha-se apresentado acima uma relação um pouco extensa de plantas medicinais com propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória e cicatrizante, ela não reflete a realidade nacional. Inúmeras plantas continuam sendo utilizadas na terapêutica da dor, da inflamação e da cicatrização, sem ter sofrido validação farmacológica. Dessa forma, investigação pré-clínica de plantas da medicina popular representa uma necessidade que não pode ser ignorada ou desprezada.

Tendo em vista a crescente recorrência no uso de produto de origem natural o Ministério da Saúde do Brasil e outros nove ministérios assinaram a Portaria interministerial nº 2.960/2008 onde foi instituído o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Com vista a atingir o objetivo que visa garantir a população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o desenvolvimento da indústria nacional (BRASIL, 2008a).

Em janeiro de 2009, o Ministério da Saúde do Brasil divulgou uma lista com 71 plantas que podem ser utilizadas como medicamento fitoterápico e nesta lista consta a planta em estudo a *Chenopodium ambrosioides*.

3.8 Família Chenopodiaceae e o gênero *Chenopodium*

A família Chenopodiaceae tem como sinonímia Amarantaceae. Pela regra de nomenclatura botânica usou-se o nome de família mais antigo, no caso Amaranthaceae resultando nesse caso particular, ao desaparecimento da família Chenopodiaceae (LORENZI; SOUZA, 2008). A família Amaranthaceae tem 169 gêneros e cerca de 2.360 espécies, sendo os maiores gêneros *Atriplex* L. (300 spp.), *Gomphrena* L. (120 spp.), *Salsola* L. (120 spp.), *Alternanthera* Forssk. (100 spp.), *Chenopodium* L. (100 spp.), *Ptilotus* R. Br. (100 spp.), *Suaeda* Forssk. ex J.F.Gmelin (100 spp.), *Iresine* R. Browne (80 spp.), *Amaranthus* L. (60 spp.), *Corispermum* L. (60 spp.) e *Celosia* L. (50 spp.) (FANK-DE-CARVALHO; MARCHIORETTO; BÃO, 2010).

Esta família apresenta grande diversidade de estrutura foliar, com plantas de anatomia Kranz e não-Kranz. A anatomia Kranz tem um tipo diferente de fotossíntese a C₄, nesse tipo de fotossíntese a fase escura e a fase clara ocorrem separadas no tempo e no espaço, ou seja, uma ocorre em determinado tecido e outra em outro, uma em uma hora do dia, outra em outra hora do dia, o que a torna interessante para estudos no sentido de compreender a evolução dos diferentes metabolismos fotossintéticos (FANK-DE-CARVALHO; MARCHIORETTO; BÃO, 2010; COSTA; TAVARES, 2006).

O gênero *Chenopodium* L. compreende cerca de 100 espécies, a maioria destes são cosmopolitas e estão distribuídos principalmente nas regiões subtropicais e temperadas (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2011). Investigações fitoquímicas sobre as espécies do gênero *Chenopodium* revelaram grande variedade de compostos orgânicos sendo eles: terpenos, esteroides, saponinas triterpênicas, flavonoides e alcaloides (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009). Algumas espécies deste gênero possuem várias aplicações tradicionais, mas algumas merecem maior atenção e têm sido testadas em diferentes atividades biológicas (YADAV et al., 2007).

A *Chenopodium foliosum* Asch também é conhecida na medicina popular Bulgária como “garliche” ou “svinski yagodi” (bagas de porco). As partes aéreas têm sido usadas na forma de decocção para tratamento de câncer e como estimulante do sistema imune. A investigação fitoquímica de *C. foliosum* levou ao isolamento e identificação estrutural de cinco flavonoides glicosilados (KOKANOVA-NEDIALKOVA et al., 2011).

A *Chenopodium quinoa* Willd conhecida popularmente como “quinoa”, é bem conhecida na comunidade Andina como um alimento de primeira necessidade. A semente contém alto teor de proteínas e carboidratos apresentando um alto valor nutricional com qualidade superior a de muitos cereais, como o milho, aveia, trigo e arroz (KULJANABHAGAVAD et al., 2008). A “quinoa” apresenta como metabólitos secundários saponinas triterpênicas, terpenos, esteroides, amidos, alcaloides e fenóis (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009) também apresenta ecdisteróides na sua composição (KUMPUN et al., 2011). As sementes têm sido usadas para a prevenção de enfermidades crônicas como a osteoporose, atividade cicatrizante, antimicrobiana e agem como imunomoduladoras (KULJANABHAGAVAD et al., 2008; MUJICA; JACOBSEN, 2006).

Outra espécie que merece destaque é a *C. album* L. conhecida no Brasil como “ançarinha-branca”. É uma erva daninha anual. Suas sementes germinam gradativamente e permanecem no solo por muitos anos (SIDDIQUI; BAJWA; JAVAID, 2009; SPEHAR; SANTOS; NASSER, 2003). Apresenta atividade antibacteriana (SINGH; DWEVEDI; DHAKRE, 2011), anti-helmíntica, laxativa e antinociceptiva (YADAV et al., 2007). As atividades apresentadas estão relacionadas aos seus metabólitos secundários como os flavonoides, esteroides, terpenos e saponinas (KOKANOVA-NEDIALKOVA; NEDIALKOV; NIKOLOV, 2009; RUSSO; GRASS; LEICACH, 2011).

A *Chenopodium ambrosioides* L., apresenta sinônimos como *C. abovatum* Moq., *C. ambrosioides* var. *typicum* Speg., *Ambrina spathulata* Moq., *Blitum ambrosioides* (L). Ela é conhecida popularmente como “erva de Santa Maria”, “mastruço”, “ambrosina”, “mastruz”, “erva-de-bicho”, “mentruz” ou “erva-do-formigueiro”, sendo muito empregada na medicina caseira na região centro oeste, sul e sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002). É uma planta originária da América Central e do Sul, ocorre em todos os países tropicais e temperados de

forma silvestre ou cultivados é considerada com planta invasora (LORENZI; MATOS, 2002; MONZOTE et al., 2009).

Lorenzi e Matos (2002) a descreveram botanicamente como planta perene ou anual, muito ramificada, podendo atingir até 1 m de altura (Figura 9). Possui folhas simples, alternadas, pecioladas, de tamanho diferente, sendo menores e mais finas nas extremidades superiores. As flores são pequenas, verdes, dispostas em espigas axilares densas. Os frutos são muito pequenos e do tipo aquênio, esféricos, pretos, ricos em óleo e muito numerosos, geralmente confundidos com sementes. Toda a planta tem um odor forte e característico (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 9. Partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides*. Fonte: Autora



A planta triturada é comumente utilizada para alívio de dor, inflamação, como cicatrizante, em contusão, fraturas, problemas respiratórios, como diurética, em processos inflamação, bronquite, tuberculose, como abortiva e em reumatismo. Entretanto, é a sua ação anti-helmíntica que a caracteriza como erva medicinal. Segundo a OMS é uma das plantas medicinais mais utilizadas entre os remédios

tradicionais no mundo inteiro (LORENZI; MATOS, 2002; COSTA; TAVARES, 2006; MONZOTE et al., 2009).

Estudos etnofarmacológicos registram que a população brasileira utiliza *C. ambrosioides* na forma de chás, infusões ou xaropes, no tratamento de afecções pulmonares e distúrbios intestinais (CHEVALLIER, 1996), hemorróidas (MASUCCI, 1992), inflamações (IBIRONKE, et al., 2007), infecções fúngicas e helmínticas (VIEIRA, 1992), úlceras (FRANÇA et al., 1996), contusões e equimoses (LORENZI; MATOS, 2002).

Segundo Nascimento e colaboradores (2006), a ação vermífuga e antibacteriana da planta é atribuída ao seu óleo essencial. Entretanto, apesar da larga utilização, alguns relatos de toxicidade têm sido encontrados, podendo causar convulsão, vômito, dor de cabeça e vertigem (CHEVALLIER, 1996; RUFFA et al., 2002).

Nascimento e colaboradores (2006), demonstraram que o extrato hidroalcoólico das folhas de *C. ambrosioides* inibiu de forma significativa o tumor de Ehrlich sólido e ascítico. Essa inibição foi observada quando os animais foram tratados com extrato hidroalcoólico das folhas por via intraperitoneal, 48h antes ou 48h depois a implantação do tumor de Ehrlich na pata esquerda (tumor sólido) ou na cavidade peritoneal (tumor ascítico).

Utilizando testes preliminares de analgesia e inflamação, Ibironke e colaboradores (2007), avaliaram o extrato metanólico das folhas secas de *C. ambrosioides* em camundongos. Nos modelos de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, teste da placa quente e teste de formalina, o extrato mostrou-se ser eficaz em reduzir os processos inflamatórios e nociceptivo respectivamente apenas na dose de 700 mg/kg.

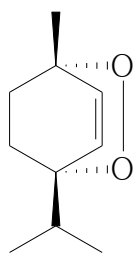
Patrício e colaboradores (2008), investigaram o efeito do extrato bruto hidroalcoólico das folhas *C. ambrosioides* em úlceras cutâneas induzidas por *Leishmania amazoniensis* em camundongos. O extrato foi administrado por via oral ou por aplicações intralesionais na dose de 5 mg/kg. O tratamento intralesional mostrou-se capaz de inibir a progressão da úlcera, já o tratamento oral não teve efeito inibitório.

Estudos demonstram que a *C. ambrosioides* também possui atividades moluscicida (HMAMOUCHI; LAHLOU; AGOUMI, 2000), larvicida (MORSY et al.,

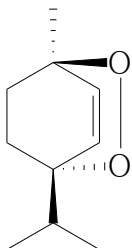
1998), alelopática (OSORNIO; KUMAMOTO; WASSER, 1996), antibacteriana (LALL; MEYER, 1999).

Fitoquimicamente a planta apresenta valores considerados de terpenos (JARDIM et al., 2008; DEMBITSKY, 2008; MONZOTE et al., 2009). Em um screening fitoquímico foi observado à presença de flavonoides (livre e combinado) e alcaloides (HEGAZY; FARRAG, 2007).

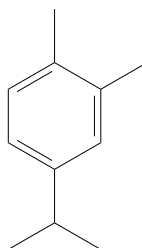
Jardim e colaboradores (2008) estudaram a composição química e a atividade antifúngica do óleo essencial (OE) de *C. ambrosioides*. Através de análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) 13 compostos foram identificados, sendo os quatro mais importantes: (Z)-ascaridol (61,4%) (**1**), (E)-ascaridol (18,6%) (**2**), carvacrol (3,9%) (**3**) e p-cimeno (2%) (**4**). Os autores verificaram que os ascaridois são os principais compostos com propriedades antifúngicas. Nos estudos foi verificado que o OE bruto inibiu completamente o crescimento micelial de todos os oito ensaios com fungos a uma concentração de 0,3%, comprovando atividade antifúngica.



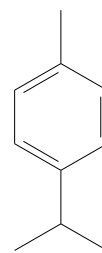
(Z)-ascaridol (**1**)



(E)-ascaridol (**2**)



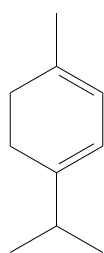
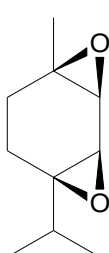
carvacrol (**3**)



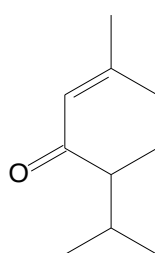
p-cimeno (**4**)

O monoterpeno ascaridol (**1**) em altas doses pode causar convulsões, irritação de mucosas, vômitos, vertigens, dores de cabeça, problemas renais e hepáticos, e surdez temporária (RUFRA et al., 2002; CAVALLI et al., 2004; VALERIO; PINHEIRO, SOUZA, 2008/2009). O ascaridol presente neste gênero mostrou efeito sedativo, analgésico e atividade anti-helmíntica (OLAJIDE et al., 1997)

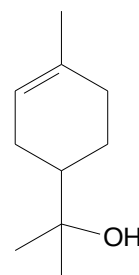
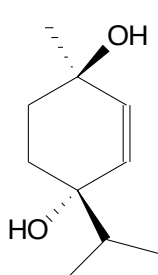
Além do ascaridol são encontrados outros hidrocarbonetos terpênicos como: p-cimeno (**4**), α -terpineno (**5**), isoascaridol (**6**), piperitona (**7**), carvacrol (**3**), α -terpineol (**8**), 1,4-diidroxi-p-ment-2-eno (**9**) e 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano (**10**). (CAVALLI et al., 2004; JARDIM et al., 2008).

 α -terpineno (5)

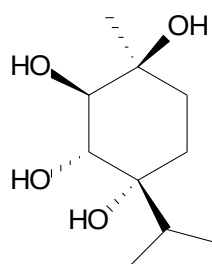
isoascaridol (6)



piperitona (7)

 α -terpineol (8)

1,4-diidroxi-p-ment-2-eno (9)



1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano (10)

Tendo em vista os poucos estudos científicos sobre a atividade anti-inflamatória administrada de forma tópica e sistêmica, poucos estudos de analgesia e nenhum estudo envolvendo o processo cicatricial com *C. ambrosioides*, e sendo a planta de fácil cultivo e encontrada facilmente no Brasil, torna-se importante colaborar na elucidação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e cicatrizante desta espécie, amplamente utilizada terapeuticamente pela população Matogrossense.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

C. ambrosioides foi coletada no município de Cáceres, estado de Mato Grosso, Brasil, em março de 2010. Um exemplar foi submetido à análise botânica, para identificação segura da espécie. Uma exsicata de nº HBR 52802 encontra-se depositada no Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, SC.

O material botânico foi seco espontaneamente a sombra, após a estabilização do material vegetal o mesmo foi separado em folhas e caules. Posteriormente as folhas e caules foram processadas separadamente com mixer (Mixer de Alimentos Mallory Robot Classic, 2 laminas e facas duplas), e após trituradas foram submetidos separadamente ao processo de extração.

4.2 Obtenção dos extratos e purificação dos compostos

As folhas (2,22 kg) e caules (1,24 kg) da *C. ambrosioides* foram secas, trituradas e posteriormente submetidos separadamente a processo de maceração com etanol (EtOH) durante 7 dias. Após filtração, o solvente foi removido por destilação em rotavapor (TECNAL TE-2II) sob pressão reduzida à temperatura máxima de 45°C para obtenção dos respectivos extratos.

Os extratos foram submetidos ao processo de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se placas de sílica gel 60 GF₂₅₄ de 20 µm de espessura preparada sobre folhas de alumínio (Merck). Diferentes sistemas de eluentes foram utilizados dependendo da polaridade das amostras. Após a eluição, as cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta antes da revelação destrutiva da amostra. Como revelador na CCD foi utilizado o anisaldeído sulfúrico (AS) (identificação de terpenos e esteroides). As cromatoplasmas foram vaporizadas com AS e em seguida aquecidas à temperatura de 105°C. Os extratos foram reunidos devido ao perfil cromatográfico similar, analisado por CCD.

O extrato EtOH das folhas e caules (9,37 g) foi submetido à coluna cromatográfica (CC) utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (161,92 g) proveniente da Merck de granulometria 70-230 mesh (ϕ = 0,063 – 0,20 mm),

diâmetro interno da coluna ϕ_{int} 5,5 cm. A eluição iniciou com hexano (Hex) 100%, posteriormente misturas de Hex e acetato de etila (AcOEt) aumentando gradativamente a polaridade e finalizando com metanol. Esta coluna foi denominada **coluna 1**. Foram coletadas 220 frações que foram acompanhadas por CCD. Após verificação do perfil químico, as mesmas foram reunidas de acordo com a semelhança cromatográfica. O volume de cada fração variou de 20 a 30 mL. Da fração **38-51** eluída com Hex: AcOEt 95:5 foi obtida uma substância denominada de **CAA-38** (368,70 mg).

Com a fração **131-154** (811,67 mg) obtida da **coluna 1** eluída com Hex: AcOEt 60:40 foi realizada nova CC de sílica gel (90,86 g, ϕ_{int} 4,0 cm), denominada **coluna 2**. Foram obtidas 53 frações com aproximadamente 20 mL cada. Da fração **15** eluída com Hex: AcOEt 70:30 foi obtida uma substância denominada **CAD-15** (188,62 mg).

Os solventes utilizados foram provenientes dos Laboratórios Dinâmica, Quimex ou Vetec. As frações coletadas foram reunidas conforme as semelhanças de fator de retenção (R_f) identificadas na CCD.

As substâncias isoladas nos diversos procedimentos foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono-13 (RMN ^{13}C) para elucidação de sua estrutura. Utilizou-se o espectrômetro BRUKER AC-300F, 300MHz. Foram utilizados solventes deuterados (clorofórmio e metanol), provenientes de Cambridge Isotope Laboratories Inc.

Outras colunas foram realizadas na tentativa do isolamento das substâncias de interesse farmacológico. No entanto, foram omitidas no presente trabalho por não ser possível obter nenhuma substância, com elevado grau de pureza.

4.3 Incorporação do extrato etanólico em creme e pomada

As formulações semissólidas foram desenvolvidas contendo 1, 3 e 5% do extrato das folhas e caules de *C. ambrosioides*. As bases foram preparadas com característica emulsiva (creme não-iônico) e pomada. O extrato foi levigado com propilenoglicol antes de ser incorporado as bases.

A formulação semissólida do tipo creme esta descrita no quadro 2. O creme não-iônico (Polawax[®], cera auto-emulsionante não-iônica composta de álcoois

graxos superiores) foi preparado pelo método de emulsificação com inversão de fases, onde os compostos hidrofóbicos (fase A) e hidrofílicos (fase B), foram colocados em béqueres separados e aquecidos até a temperatura de 70°C em banho-maria. Após o aquecimento, os compostos da fase B foram lentamente adicionados a fase A ainda em aquecimento, sob agitação leve e constante. Permaneceram em aquecimento na mesma temperatura, sob agitação, por mais um minuto. Depois foram retirados do banho-maria e deixados esfriar até temperatura ambiente, sob agitação lenta e constante.

Quadro 2: Composição da formulação semissólida emulsiva.

Componentes	Concentração (%)
Polawax [®]	12
Crodalax [®]	3
Nipazol [®]	0,02
Nipagin [®]	0,18
BHT	0,1
EDTA	0,1
Propilenoglicol	5
Água purificada	Qsp

A pomada (Quadro 3) foi preparada pelo método de fusão, onde os compostos hidrofóbicos (fase A) e hidrofílicos (fase B) foram colocados em béqueres separados. A fase A foi levada a banho-maria para facilitar a solubilização. Posteriormente os compostos da fase B foram lentamente adicionados à fase A, e ainda em aquecimento, adicionou-se o composto polietilenoglicol 4000 (PEG 4000) até completa solubilização. Depois foi transferido para um gral e mantida agitação constante até o esfriamento e completa solidificação.

Quadro 3: Composição da formulação semissólida do tipo pomada

Componentes	Concentração (%)
PEG 400 [®]	83,5
PEG 4000 [®]	16
Fenoxietanol	0,2
Vaselina líquida	0,2
BHT	0,1

As bases foram acondicionadas em bisnaga de plástico e alumínio de 15g, com lacre e tampa.

4.4 Avaliação farmacológica

4.4.1 Animais

Em todos os ensaios biológicos foram utilizados camundongos “Swiss” machos (20-30g), com exceção do experimento de cicatrização cutânea, no qual foi utilizado ratos “Wistar” machos (200 a 250 g), criados e mantidos no Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Os animais foram mantidos à temperatura de 22 ± 3 °C e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração *ad libitum*, e mantidos no laboratório 24 horas antes da realização dos experimentos para aclimação. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas internacionais para estudo com animais de laboratório (ZIMERMANN, 1983), onde o número de animais por grupo experimental foi o mínimo necessário para se obter resultados estatísticos. O protocolo experimental foi submetido ao comitê de ética e pesquisa da UNIVALI, CEP/UNIVALI, tendo recebido aprovação com parecer de número 23/10 de 29/07/2010.

4.4.2 Drogas e soluções

As substâncias utilizadas foram: óleo de cróton, ácido araquidônico, capsaicina, bradicinina, prostaglandina E₂, carragenina lambda grau IV, substância

P, captopril, indometacina, dexametasona e PBS, todos obtidos da Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA e o formaldeído (CAQ – Casa da Química Ind. E Com. LTDA). Heparina TM, azul de Evans e solução de Turk (Merck, RJ, Brasil), May-Grunwald (Newprov, Pinhais, PR, Brasil) e Giemsa (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Azida de sódio (JB Química Indústria e Comércio LTDA), fosfato de adenosina tamponada (JB Química Indústria e Comércio LTDA), nitrato (Nicron Química LTDA). Veículo utilizado: solução salina com 1 gota/ml de Tween (1 gota=50 µL),

As soluções de estoque de todas as drogas utilizadas foram preparadas em PBS (1-10 mM), diluídas na concentração adequada no momento de uso. As drogas e os extratos foram dissolvidos em solução salina, com exceção da CAP que foi dissolvida em etanol absoluto.

4.4.3 Avaliação da propriedade anti-inflamatória

4.4.3.1 Modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos

O método foi realizado conforme descrito por Zanini e colaboradores (1992). Inicialmente a orelha direita dos animais foi medida com o auxílio de um micrômetro digital (medida basal). Em seguida os animais receberam na superfície interna da orelha direita, o creme com extrato etanólico bruto (EEB) das folhas e caules de *C. ambrosioides* em diferentes concentrações (1%, 3% e 5%). Outros dois grupos de animais receberam respectivamente creme de dexametasona (0,5% - controle positivo) e somente a base (creme sem ativo - controle negativo). Decorridos 30 minutos após estes tratamentos, o edema de orelha foi induzido. Cada animal recebeu 20 µL de um agente flogístico como óleo de cróton (1 µg/orelha), CAP (250 µg/orelha), AA (2 mg/orelha) na face externa da orelha direita dos camundongos. Decorridos respectivamente 6 horas, 30 minutos e 60 minutos, as orelhas foram novamente medidas e o edema foi novamente avaliado. A diferença entre a espessura basal e a final foi expressa em mm e tomada como indicativo de edema (ZANINI et al., 1992).

4.4.3.2 Modelo de edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos

Os experimentos foram conduzidos de acordo com Tratsk et al. (1997) com algumas modificações. O EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* foi administrado aos animais por gavagem (150, 300 e 500 mg/kg), 1 hora antes da injeção intraplantar (via i.pl.) de 50 µL na pata direita dos animais de um dos agentes flogísticos: Cg (300 µg/pata) (MENEZES DE LIMA JR et al., 2006), SP (20 nmol/pata) (CUNHA et al., 2001), BK (3 nmol/pata) (MENEZES DE LIMA JR et al., 2006) e PGE₂ (3 nmol/pata) (MENEZES DE LIMA JR et al., 2006), diluídos em salina tampão fosfato. No modelo de edema de pata induzido por BK, os animais foram pré-tratados 1 hora antes com captopril (5 mg/kg, via s.c.), para prevenir a degradação da bradiginina (CAMPOS; CALIXTO, 1995). Na pata posterior esquerda foi administrado 50 µL de solução salina e foi usada como controle. Grupos controle também foram avaliados, sendo os controles positivos tratados com indometacina (10 mg/kg) também administrada oralmente 1 hora antes da injeção intraplantar dos indutores do processo inflamatório, e os negativos tratados com o veículo no qual o extrato foi diluído.

O edema de pata foi avaliado plestimometricamente (Pletismômetro LE 7500, serie 6063/02, Letica Scientific Instruments) em diferentes intervalos de tempo, após a injeção dos agentes flogísticos. No caso do edema induzido por Cg foram realizadas medições em 0,5, 1, 2, 4, 6, 24 e 48 horas; para SP os tempos foram de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos; BK 10, 20, 30, 60 e 120 minutos; PGE₂ 30, 60, 120 e 240 minutos, após a injeção do agente flogístico. A variação do volume da pata foi expressa em µL (microlitros) e a diferença entre o volume das patas direita e esquerda, foi tomada como índice de edema (BUSNARDO et al., 2010).

4.4.3.3 Pleurisia induzida por carragenina

Os ensaios foram conduzidos conforme descrito por Busnardo e colaboradores (2010), com algumas modificações. Para a indução experimental da pleurisia (SALEH; CALIXTO; MEDEIROS, 1997; VIANNA; CALIXTO, 1998). Decorridos 30 minutos da injeção de Azul de Evans, grupos de animais foram previamente tratados com o EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* (150, 300 e

500 mg/kg do peso do animal via oral) e indometacina (10 mg/kg) foi usado como medicamento de referência.

Após 1 hora de tratamento os mesmos foram levemente anestesiados com éter etílico e em seguida foi administrado na cavidade pleural direita (injeção intrapleural), através do espaço intercostal, 0,1 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) contendo carragenina (1%), ou somente salina (grupo controle) (PEREIRA; MEDEIROS; FRODE, 2006).

Quatro horas após a administração do agente flogístico, os animais foram sacrificados com overdose de éter etílico. A seguir o apêndice xifoide foi pinçado e através de uma incisão abaixo do esterno, os pulmões e a cavidade pleural foram expostos. Logo após esta operação, a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de solução salina heparinizada (PBS) (20 UI/mL). Posteriormente, o volume líquido da cavidade pleural foi coletado com auxílio de pipetas automáticas e processado para posterior determinação do número total e diferencial de células e de exsudação.

A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando câmara de Neubauer espelhada e microscópio óptico, com prévia diluição de 10 µL do exsudato em 200 µL do líquido de Turk (2% de ácido acético).

A contagem diferencial foi efetuada, realizando-se a leitura das amostras fixadas em 3% de ovoalbumina, sendo seca a temperatura ambiente e corados pelo método May-Grunwald-Giemsa. A mesma foi realizada em microscópio óptico com o auxílio de objetiva de imersão, contando aproximadamente 100 células por lâmina.

4.4.3.4 Quantificação da mieloperoxidase (MPO) e determinação da enzima adenosina-deaminase (ADA) em atividades induzida por carragenina

Os ensaios abaixo descritos foram realizados nos laboratórios de Imunologia da UFSC, sob orientação da Profa. Dra. Tânia Silva Frode.

Amostras do exsudato pleural do controle de *C. ambrosioides* (150-500 mg/kg, v.o.) foram coletadas de animais tratados e imediatamente processados para analisar a atividade da MPO e ADA.

A quantificação de MPO foi efetuada de acordo com os métodos desenvolvidos por Frode e Medeiros (2001). Alíquotas pleural e normal foram transferidas para as cubetas e a reação foi iniciada com a adição de 360 µl de tampão de ensaio (0,167 mg/ml o-dianisidina 2HCL e 0,0005% H₂O₂). A reação foi

interrompida com azida de sódio a 1%. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 50 x g por 5 min., o sobrenadante foi separado e a concentração da enzima foi estimada por meio de medições colorimétricas (absorbância a 450 nm), em ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando leitor de placas (Organon Técnica, Roseland, NJ, E.U.A.). Os resultados foram expressos em mU/mL.

O ensaio da atividade ADA foi conduzido de acordo com Dalmarco e colaboradores (2002), com algumas modificações. Amostras de fluidos da cavidade pleural foram transferidas para cubetas e a reação foi iniciada pela adição de fosfato de adenosina tamponada. Após a incubação por 1h a 37°C a reação foi interrompida com a adição de uma solução de fenol, nitroprussiato e tampão alcalino. Esta solução foi adicionada a cubetas com as amostras diferente. A concentração da enzima foi estimada por meio de medições colorimétricas (absorbância 620 nm) em ensaio imunoenzimático (ELISA) leitor de placas (Organon Técnica, Roseland, NJ, E.U.A.). Os resultados foram expressos em U/L.

4.4.3.5 Análise dos níveis de TNF- α e Óxido nítrico

Os ensaios abaixo descritos foram realizados nos laboratórios de Imunologia da UFSC sob orientação da Profa. Dra. Tânia Silva Frode.

Os níveis de TNF- α foram avaliados utilizando o método previamente descrito por Bandeira-Melo et al (2000). Após 4h da indução da pleurisia por Cg, os animais foram sacrificados e amostras do exsudato foram coletadas e armazenadas a -70°C. O líquido pleural recuperado foi centrifugado a 770 x g por 10 min e o sobrenadante livre de células foi quantificado o conteúdo de TNF- α pelo ensaio imunoenzimático (ELISA – Nunc Maxsorp). A quantificação foi realizada utilizando um leitor de microplaca na absorbância de 490 nm.

O NO foi medido como seus produtos de degradação nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Amostras do exsudato pleural obtido dos controles (negativo e positivo), e de *C. ambrosioides* (150-500 mg/kg, v.o.) foram coletadas de animais tratados, separadas e armazenadas a -20°C. As amostras (0,1 ml) foram transferidas para cubetas, e cloreto de vanádio 0,05 M (0,15 ml) em HCL 1.0 M (0,05 ml) foi adicionado para reduzir nitrato em nitrito. Imediatamente o reagente de Griess (150 μ l de dicloridrato de naftiletilenodiamina (0,004M) em água e sulfanilamida 0,06 M

(150 µl) em H₃PO₄ 0,03M, vol. 1:1) foi adicionado. Após a incubação a 37° C por 45 min., a reação foi transferida para uma microplaca. As concentrações de nitrito foram estimadas por interpolação a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (0-150 µM) por meio de medições colorimétricas a 540 nm em um leitor de placas ELISA (Organon Técnica, Roseland, NJ, EUA). Os resultados foram expressos em µM.

4.4.4 Avaliação da atividade antinociceptiva em modelos de dor aguda

4.4.4.1 Nocicepção induzida por Formalina

O teste da formalina foi realizado de acordo com Dubuisson e Dennis (1977), com algumas modificações. O EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides*, nas doses de (150, 300 e 500 mg/Kg, v.o), solução fisiológica estéril 0,9% (controle negativo, v.o) e controle positivo indometacina (10 mg/Kg, v.o), foram administrados em grupos de seis animais, uma hora antes da injeção intraplantar (i.pl) de formalina 2,5% (20 µL/ pata). Imediatamente após a administração da formalina os animais foram colocados individualmente em funis de vidro ao lado de um espelho para facilitar a observação, foi cronometrado em duas fases o tempo em que o animal passou lambendo, sacudindo (comportamento conhecido como “flinch”) ou mordendo a pata injetada (0-5'; 1ª fase; dor neurogênica); (15-30'; 2ª fase; dor inflamatória), sendo considerado tempo zero o momento imediatamente após a administração da formalina.

4.4.4.2 Nocicepção induzida por PGE2, Capsaicina e Bradicinina

Os animais foram tratados com EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg, v.o.), solução fisiológica estéril 0,9% (controle negativo, v.o), 60 min antes da injeção intraplantar de 20 µl na pata traseira direita de PGE₂ (3 nmol/pata), CAP (1,6 µg/pata) e BK (10 nmol/pata) . O tempo em que o animal permaneceu lambendo e/ou mordendo a pata injetada foi considerado como índice de nocicepção. Após receberem o estímulo nociceptivo com os agentes flogísticos acima descrito, os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e a nocicepção foi cronometrada cumulativamente durante 15 min, 10 min e 10 min

respectivamente (MATTOS et al., 2006; OTUKI et al., 2005; SAKURADA et al., 1996).

4.4.5 Avaliação da atividade cicatrizante

4.4.5.1 Indução do processo ulcerativo (cicatrização cutânea)

A metodologia adotada foi baseada em Cross et al. (1996), com algumas modificações. Todos os animais foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, independente do tratamento. Para esses experimentos foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 220-250 g.

No dia da cirurgia os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (20mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.). Após constatação de anestesia profunda, os pelos do dorso logo abaixo da região cervical foram retirados manualmente. Para a demarcação da área da ferida foi utilizado um quadrado vasado, medindo 20 x 20 mm posicionado na porção distal do dorso do animal. O desenho cicatricional foi feito com o auxílio de uma caneta de ponta fina (1,0 mm) e bisturi. Um pequeno corte foi feito perpendicular a superfície da pele. Posteriormente uma tesoura de ponta reta foi utilizada para afastar as camadas superficiais da pele e remoção completa dos tecidos adjacentes.

Imediatamente após a retirada completa da pele, os animais foram colocados na posição de “agachamento” (“crouching”) e o perímetro das feridas foi cuidadosamente limpo. Em seguida foi aplicado topicamente, 0,7 g aproximadamente de pomada a base de EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* nas concentrações 1%, 3% e 5%, um outro grupo recebeu pomada base e outro grupo não recebeu nenhum tratamento chamado controle negativo.

Após a determinação do perímetro das feridas e a aplicação dos tratamentos, os animais foram identificados e colocados em gaiolas individuais. Os cinco grupos de animais foram tratados duas vezes ao dia, durante dezenove dias e a medida da área das feridas foi realizada a partir do dia 1 estendendo-se até o dia 19, antes de cada tratamento, até a completa cicatrização da ferida do grupo controle negativo. A medida do traçado de cada ferida foi realizada diariamente em triplicata utilizando-se folha transparente, onde era desenhada a extensão da ferida. Ao final do experimento, a média foi calculada para cada medição. Os desenhos das medidas

foram digitalizados em computador com o uso de um scanner de mesa. Após a captura das imagens a área em mm² das feridas foi calculada com o auxílio do software Scion Image (Scion Corp) ou Imagej (CROSS; THOMPSON; ROBERTS, 1996).

4.4.6 Modelos adicionais

4.4.6.1 Efeito sobre a performance motora (rota-rod)

A fim de excluir um possível efeito inespecífico de *C. ambrosioides* sobre a coordenação motora, os animais tratados com EEB das folhas e caules da planta e veículo. Posteriormente foram submetidos ao teste do rota-rod de acordo com a metodologia descrita por Dunham e Miya (1957) e Bristow et al (1996). Foi utilizado o Modelo de Rota-Rod (Rota Rod/RS, LE-8500, série 1218/06, Letica Scientific Instruments), que consiste de uma barra com 2,5 cm de diâmetro, subdividido em quatro compartimentos por discos de 25 cm de diâmetro. A barra gira a uma velocidade constante de 15 rotações por minuto. Os camundongos foram selecionados 24h antes do experimento conforme sua reatividade ao teste, sendo desprezados aqueles que não conseguiram permaneceram 60 s no aparelho em 3 tentativas. No dia do experimento, os animais foram tratados com EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina), 60 minutos antes de serem submetidos ao teste. Os animais foram avaliados nos tempos de 30, 60 120 e 180 min. Os resultados foram expressos como tempo (s) em que os animais permaneceram sobre o rota-rod. O tempo máximo utilizado foi de 60 s em cada medição.

4.4.6.2 Medida da temperatura retal

Este teste foi realizado de acordo com Grieve (1951), com algumas modificações (ANSONOFF et al., 2006). Com o objetivo de excluir uma possível interferência do extrato na temperatura corporal dos animais, uma vez que substâncias analgésicas podem causar hipotermia foi averiguada a temperatura retal. A temperatura retal foi avaliada utilizando-se termômetro digital (B & D – NJ, EUA). A sonda (2 mm diâmetro) foi lubrificada com vaselina antes da inserção e o

termômetro foi mantido no reto do animal até a obtenção da leitura (20 s). A temperatura retal foi determinada antes do tratamento. Posteriormente os animais foram tratados com EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina), 60 min antes das verificações. Os animais foram avaliados nos tempos de 30, 60, 120 e 180 min.

4.4.7 Avaliação citotóxica preliminar

A fim de excluir um possível efeito tóxico de *C. ambrosioides* sobre a viabilidade celular de células não tumorais L929.

A metodologia adotada foi baseada em Mosmann (1993) com algumas modificações. Os testes foram realizados no laboratório de Farmacologia *in Vitro* (Laboratório de cultivo celular animal) da UNIVALI, sob a colaboração de Juliana Bagatini Klein. Foi utilizada a linhagem celular de origem não tumoral L929, os quais são fibroblastos obtidos a partir de camundongos (*Mus musculus*), (BCRJ CR010) crescidos a 37°C, com 5% CO₂ em meio MEM (Gibco-BRL) suplementado com Soro Fetal Bovino (Gibco) a 10% já estéril, inativado e filtrado em fluxo laminar, e 1% de mistura de antibióticos (Gibco 15640) sendo 5mg/mL de penicilina, 5mg/mL de estreptomicina e 10mg/ml de neomicina e antifúngico (Gibco) 250 µg/ml e 2mM de L-glutamina (Ajinomotto). A L-glutamina utilizada para suplementação do meio foi preparada numa solução 100x concentrada (200mM).

As células foram descongeladas em banho-maria a 37°C e posteriormente transferidas para garrafas T-25 de cultivo celular, em meio MEM, suplementado como descrito acima, e mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

O meio de cultura MEM foi trocado a cada 2 dias até uma confluência de 80-90% das células na garrafa, sendo então realizado o procedimento de tripsinização. Resumidamente, as células foram lavadas com tampão salino fosfato 0,1 M pH 7.4 (PBS). Posteriormente adicionado 1 mL de tripsina (0,25% tripsina, 0.038% EDTA) seguido de incubação em estufa a 37°C/ 5% de CO₂, por no máximo 10 minutos. A morfologia celular é utilizada como indicativo de adesão celular. A atividade da tripsina foi inativada com meio MEM contendo 10% de soro fetal bovino e íons Mg⁺⁺ e Ca⁺⁺, seguido de transferência das células para um tubo falcon de 15 mL, centrifugação a 1000 xg/10 min a 10°C, descarte do sobrenadante e ressuspensão

em meio MEM suplementado e transferências em um “split” de 1:3 a 1:6 (MOSMANN, 1983).

4.4.7.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Com o objetivo de avaliar de forma preliminar algum efeito tóxico do extrato utilizado, uma vez que o óleo essencial da planta parece ter toxidade, foi utilizado neste estudo, o teste de citotoxicidade pelo MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio brometo). O MTT (sal de tetrazólio) é convertido em sal de formazan, em células vivas, principalmente pela atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial, formando uma coloração azulada (sal de formazan) que permite a quantificação da viabilidade celular em leitor de placas (MOSMANN, 1983).

Os testes foram realizados em triplicata de experimentos independentes, em quadruplicata por experimento. As células foram plaqueadas, em placas de 96 poços, a 1×10^4 células/poço e incubadas com 200 μL de meio MEM (meio mínimo essencial) suplementado por 24h a 37°C em 5% CO_2 . Posteriormente, o meio foi removido e substituído por 180 μL de meio MEM suplementado e foram adicionadas 20 μL da substância teste em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1; 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$), controle negativo (meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB) contendo 1% DMSO) e controle positivo interno (TRITON 10%), mantidas por 24 horas em estufa a 37°C em 5% CO_2 . Após este tempo foi retirado o meio e adicionado 180 μL de MEM sem SFB e 20 μL de MTT (5 mg/mL) e incubadas por 4h a 37°C em 5% CO_2 . O meio juntamente com o MTT foi retirado e os cristais de formazan insolúveis foram dissolvidos em 100 μL de DMSO 1%. A determinação da absorbância foi realizada em leitor de microplaca a 570 nm (MOSMANN, 1983). A viabilidade relativa das células relacionadas ao controle sem as substâncias testes foi calculada conforme Equação 1.

Equação 1:
$$\text{Viabilidade relativa} = \frac{\text{Absorbância da amostra teste}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

4.5 Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados obtidos foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma e duas vias pelo teste de múltipla comparação, utilizando-se o método de Dunnet, Newman-Keuls, Tukey e Bonferroni, quando apropriado. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, exceto as DI_{50} (corresponde a doses dos extratos que reduziram a resposta para 50% em relação ao grupo controle), que foram apresentados com as médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança (95%). As porcentagens de inibição foram citadas como a média $\pm$ o erro padrão da media da diferença (em porcentagem) entre as áreas sobre as curvas obtidas para cada experimento individual em relação ao grupo controle correspondente. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativo de significância. Todas as análises citadas acima foram realizadas utilizando o programa GraphPad Instat[®] ou GraphPad PRISM[®]. A CI_{50} foi determinada pelo método de linearização de PROBITOS da viabilidade celular em função da concentração ou aproximada através da regressão sigmoidal utilizando software Origin 5.0, para o experimento com célula, utilizando-se em função do log das concentrações aplicadas.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção e fracionamento do extrato EtOH das folhas de *C. ambrosioides*

As folhas e caules da *C. ambrosioides*, após secas, foram extraídas com etanol através do processo de maceração. Utilizou-se o etanol como solvente por extrair as substâncias apolares e polares. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a temperatura inferior a 45 °C e pressão reduzida, para evitar a formação de possíveis artefatos ou decomposição das substâncias. Os rendimentos obtidos neste processo se encontram na tabela 1.

Tabela 1: Rendimentos dos caules e folhas de *C. ambrosioides* do extrato EtOH em relação ao material vegetal utilizado.

Parte da Planta	Quantidade de Material (kg)	Extrato Bruto (g)	Rendimento Total (%)
Caules	1,24	24,22	1,97
Folhas	2,22	48,44	2,18

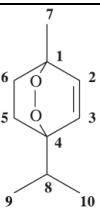
Os extratos brutos dos caules e folhas foram avaliados por CCD para verificação dos seus respectivos perfis cromatográficos. Foi observado que o perfil cromatográfico dos extratos eram bem semelhantes entre si, por isso foram reunidos para a realização das análises farmacológicas e fitoquímicas.

Uma parte do extrato EtOH das folhas e caules (9,37 g) foi submetido a coluna cromatográfica resultando em 220 frações. As frações 38 a 51, eluídas com Hex: AcOEt 95:5 apresentaram-se como um óleo, com um odor refrescante, característico de menta e uma única mancha quando avaliada por CCD. Estas foram denominadas **CAA-38**. Esta amostra foi encaminhada para a determinação da estrutura molecular através de RMN. A fração CAA 131-154 foi submetida a novo procedimento cromatográfico. Neste processo a subfração 15 apresentou-se pura e recebeu a denominação de **CAD-15**. Na figura 10 está apresentado o fluxograma dos procedimentos cromatográficos realizados.

A análise do espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do CAA-38 com auxílio do DEPT 135 (Figuras 11, 12 e 13) possibilitou a caracterização da substância majoritária presente no óleo, como um monoterpreno, denominado ascaridol (**1**).

Na tabela 2 estão apresentados os dados de RMN para a substância isolada e a comparação com dados da literatura para o ascaridol.

Tabela 2: Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C /DEPT obtidos para CAA-38 comparando com dados da literatura para o ascaridol.

 Carbono	RMN ^1H δ (ppm); J (Hz) CAA-38 (300 MHz)	RMN ^1H δ (ppm); J (Hz) Ascaridol * (300 MHz)	RMN ^{13}C /Dept δ (ppm) CAA-38 (75 MHz)	RMN ^{13}C δ (ppm) Ascaridol ** (50 MHz)
1	--	--	74,3/ C	74,3
2	6,50, d ($J=8,7$)	6,53, d ($J=8,6$)	136,4/ CH	136,4
3	6,40, d ($J=8,7$)	6,42, d ($J=8,6$)	133,0/ CH	133,0
4	--	--	79,7/ C	79,7
5	1,49-1,52, m	1,51-1,56, m	25,6/ CH ₂	25,6
6	1,99-2,05, m	1,92-1,97, m	29,5/ CH ₂	29,5
7	1,36, s	1,31, s	21,4/ CH ₃	21,4
8	1,91, sept, ($J=6,9$)	1,85, sept, ($J=6,9$)	32,1/ CH	32,1
9	0,99, d ($J=6,9$)	0,97, d ($J=6,9$)	17,2/ CH ₃	17,2
10	0,99 d ($J=6,9$)	0,98, d ($J=6,9$)	17,1/ CH ₃	17,1
Solvente	CDCl₃	CDCl₃	CDCl₃	CDCl₃

* RIBEIRO; SERRA; GONSALVES (2007)

** CAVALI et al.(2004)

Figura 10: Fluxograma dos procedimentos cromatográficos do extrato etanólico das folhas e caules de *C. ambrosioides*.

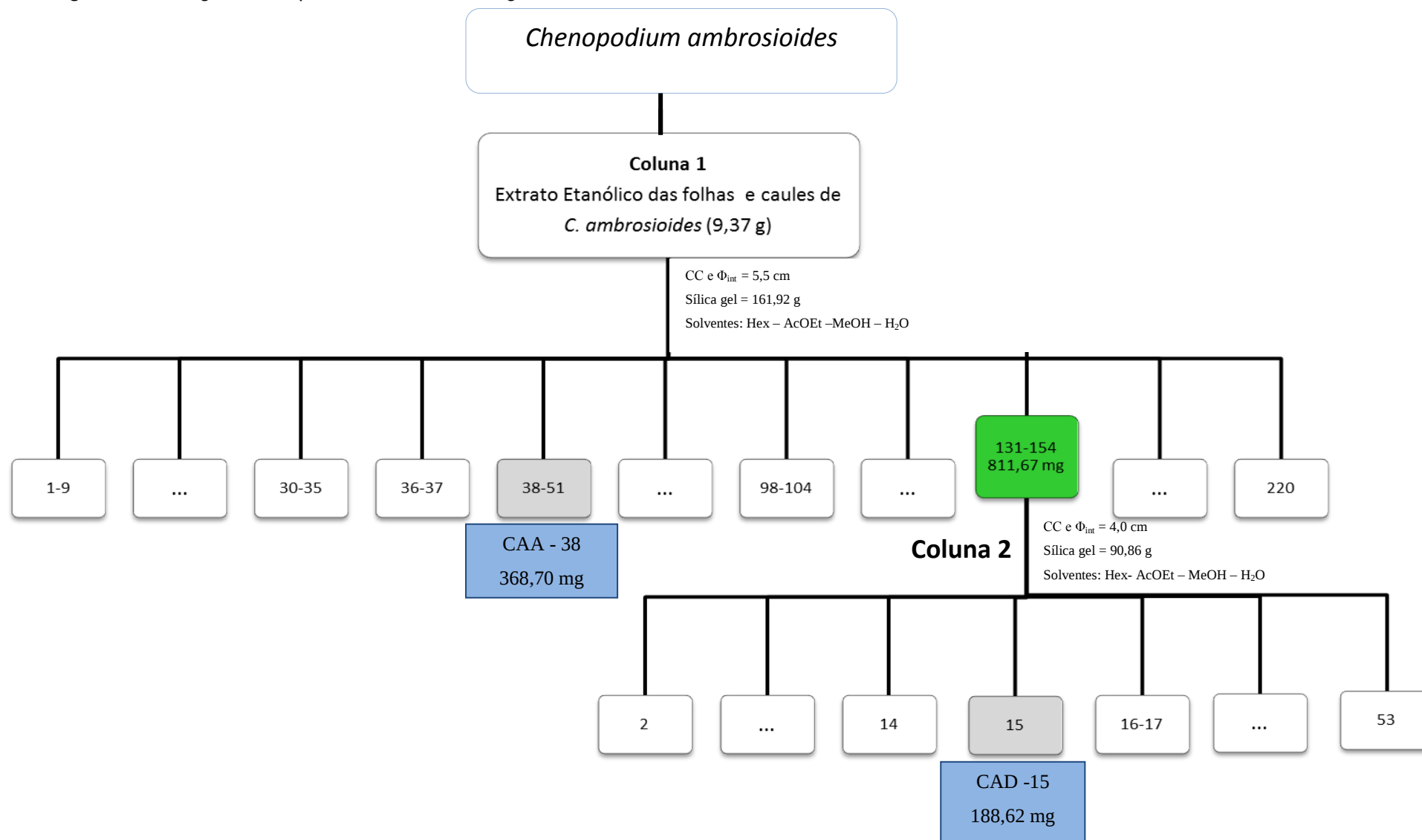


Figura 11: **a)** Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAA-38; **b)** Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAA-38.

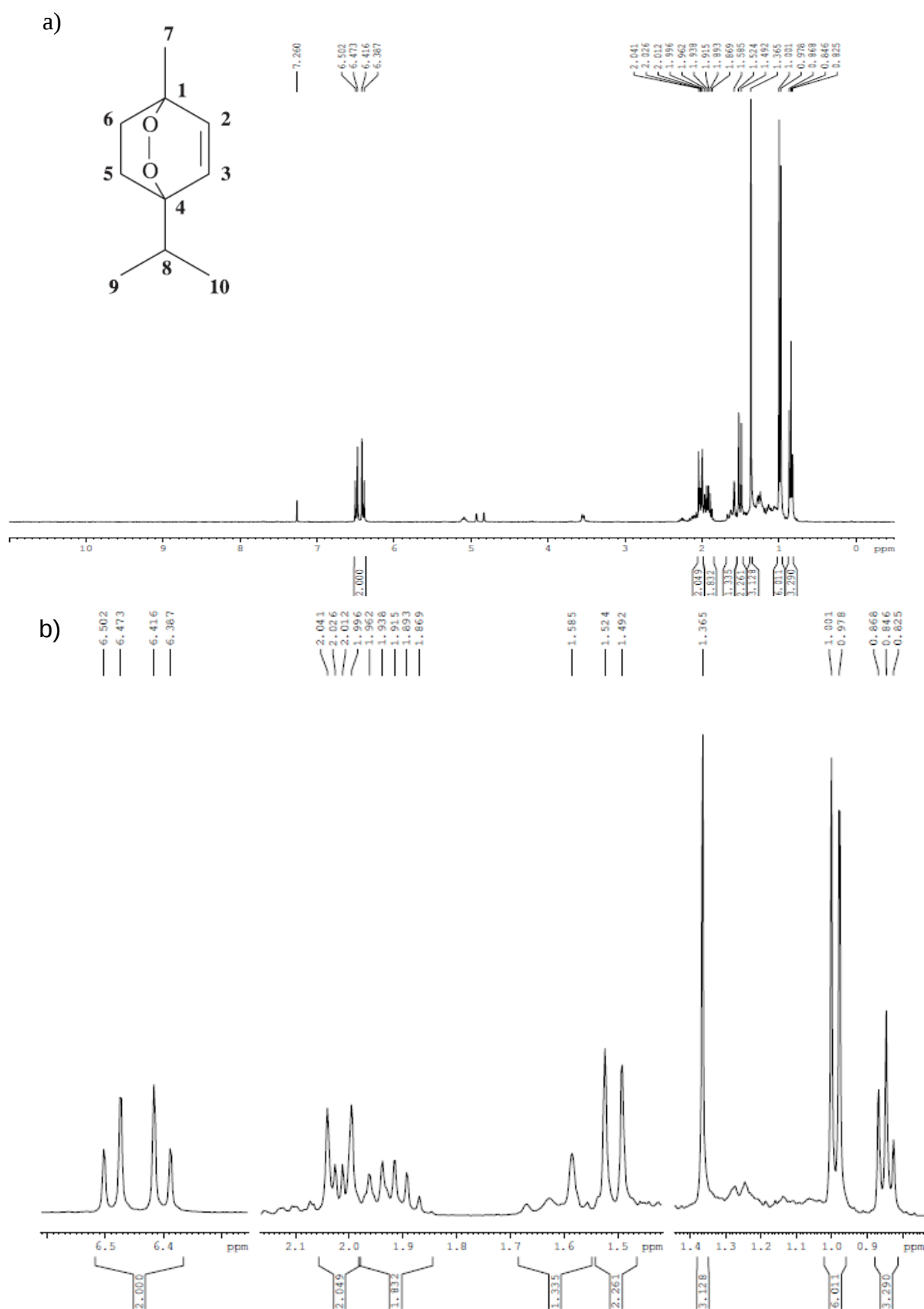


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do CAA-38.

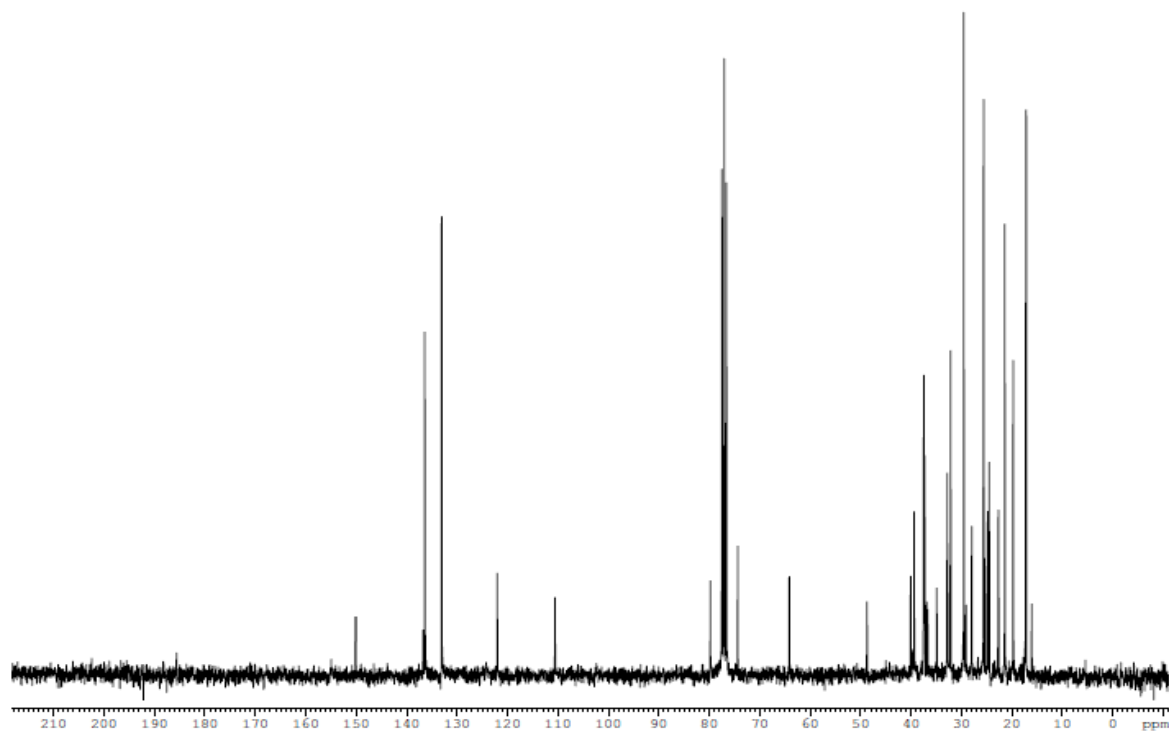
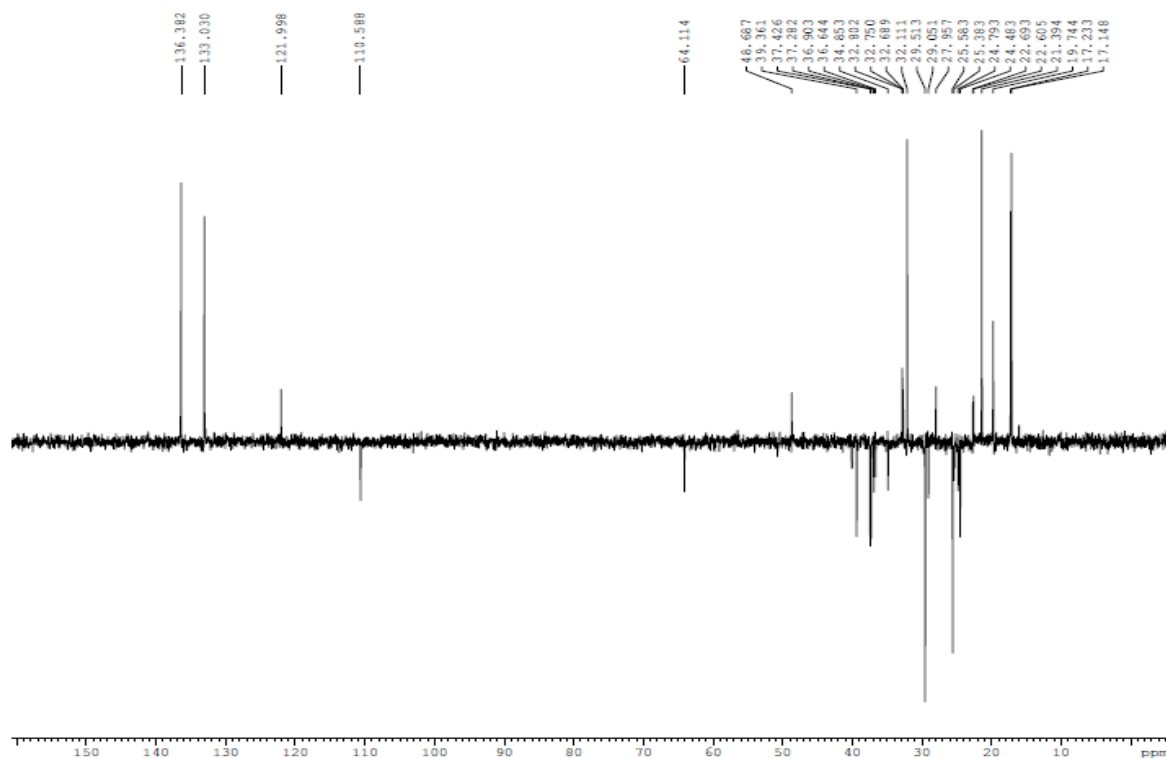


Figura 13: Espectro de DEPT 135 (CDCl_3 , 75 MHz) do CAA-38.



A análise do espectro de RMN de ^1H e de RMN ^{13}C com auxílio do DEPT 135 obtidos para o CAD-15 (Figuras 14, 15 e 16) possibilitou a caracterização da substância como o monoterpreno denominado 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano (**10**).

Na tabela 3, estão apresentados os dados de RMN para a substância isolada e a comparação com dados da literatura.

Figura 14: **a)** Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAD-15; **b)** Ampliação do espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) do CAD-15.

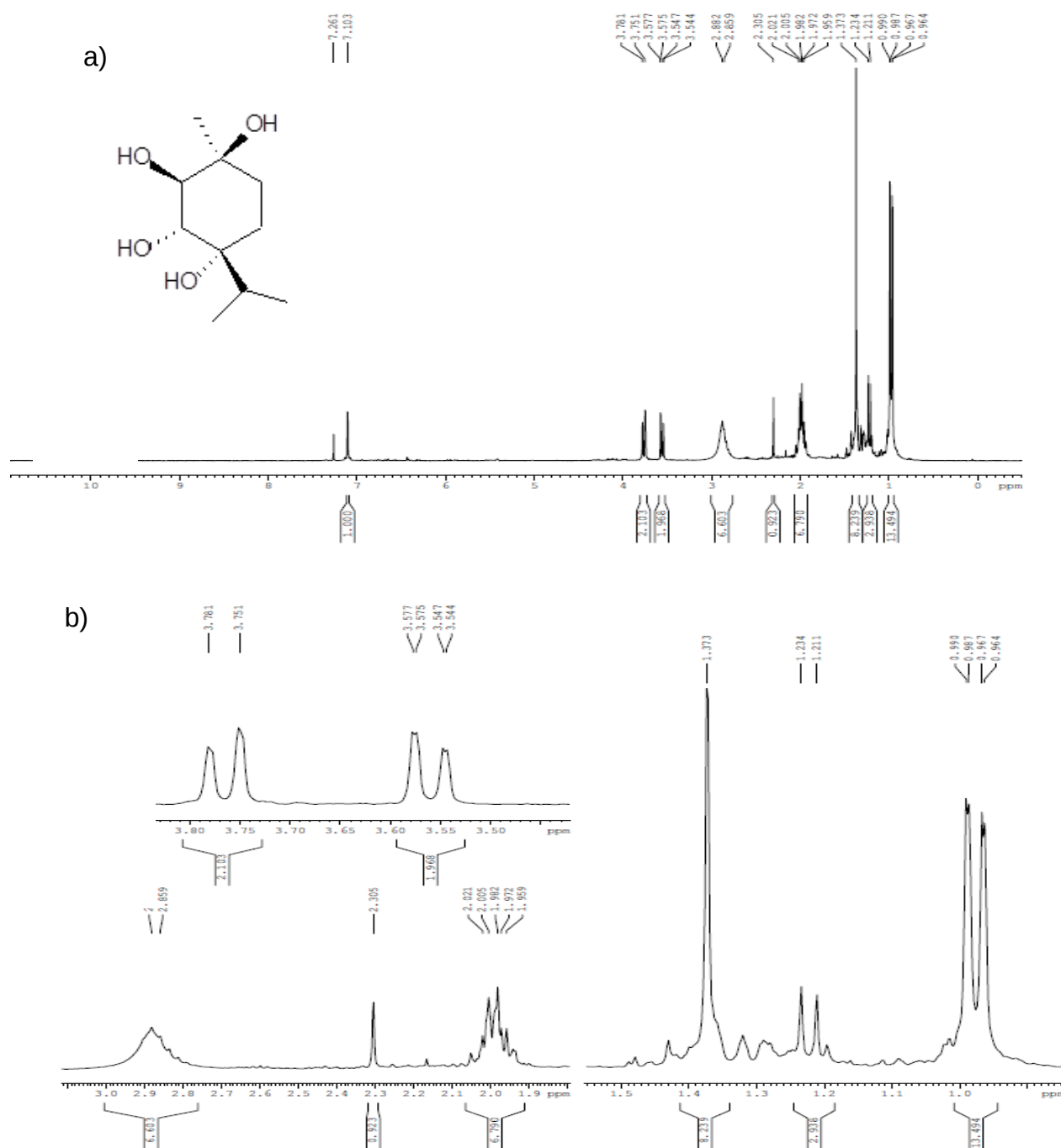


Figura 15: Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) do CAD-15

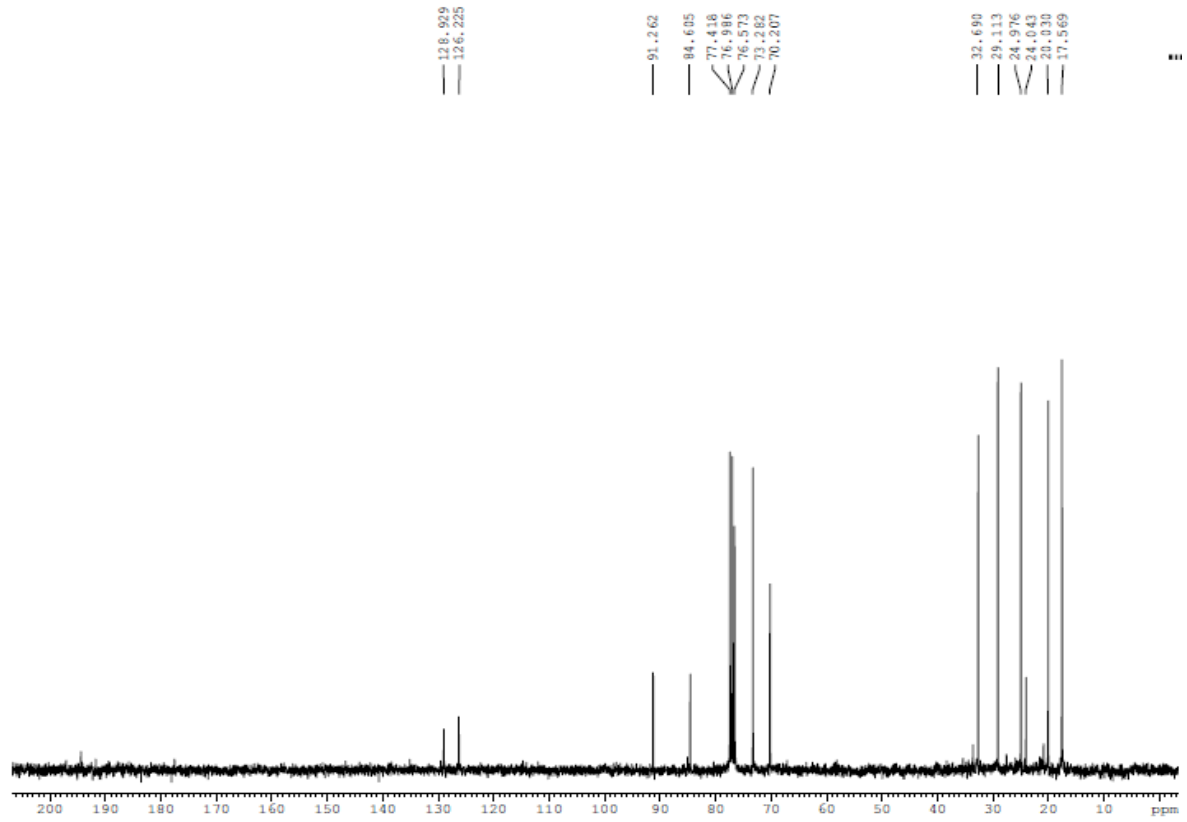


Figura 16: Espectro de DEPT 135 (CDCl_3 , 75 MHz) do CAD-15.

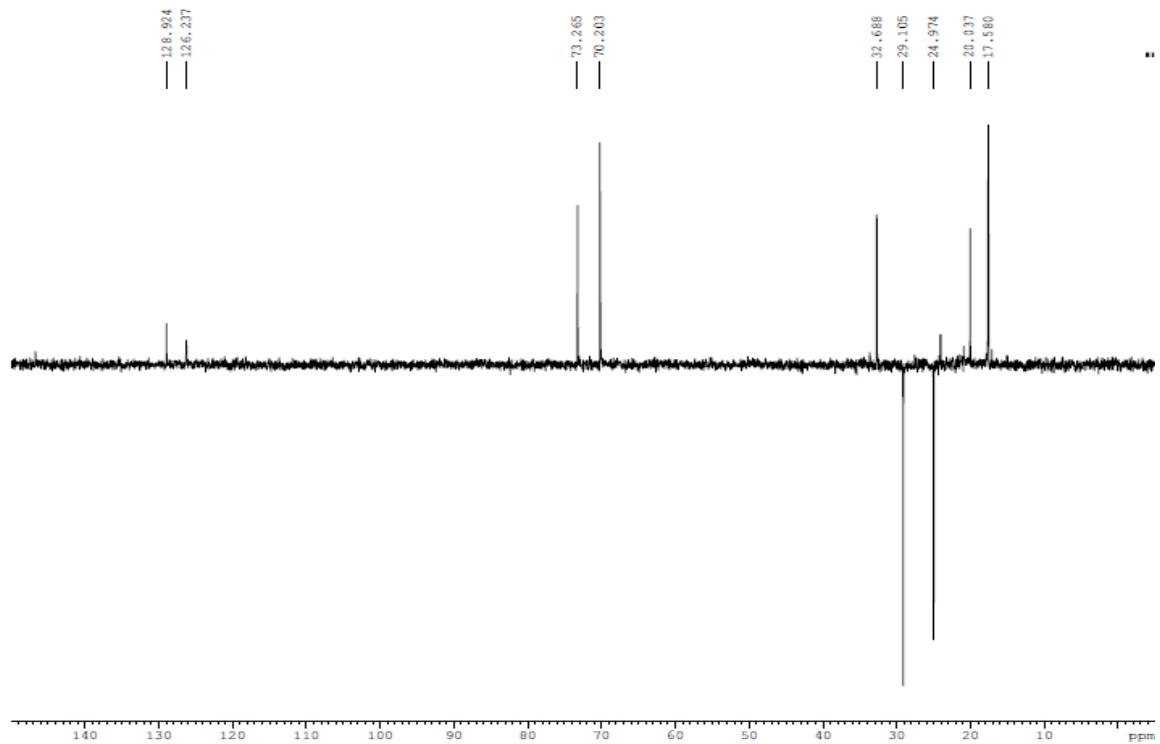
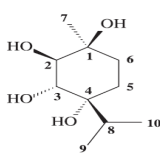


Tabela 3: Valores de deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H e ^{13}C /DEPT obtidos para CAD-15 comparando com dados da literatura para o 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano.

 Carbano	RMN ^1H δ (ppm); J (Hz) CAD-15 (300 MHz)	RMN ^1H δ (ppm); J (Hz) 1,2,3,4-tetrahidroxi- p-mentano * (400 MHz)	RMN ^{13}C /Dept δ (ppm) CAD-15 (75 MHz)	RMN ^{13}C δ (ppm) 1,2,3,4- tetrahidroxi- p-mentano ** (50 MHz)
1	--	--	84,6/ C	84,6
2	3,77, d ($J=9,0$)	3,75, d ($J=9,0$)	73,3/ CH	73,3
3	3,56, d ($J=9,0$)	3,53, d ($J=9,0$)	70,2/ CH	70,2
4	--	--	91,2/ C	91,2
5	1,20 m	1,26 m	25,0/ CH_2	25,0
6	2,00 m	1,98m	29,1/ CH_2	29,2
7	1,37 s	1,36 s	20,0/ CH_3	20,1
8	1,98, qq ($J=7,0$)	2,00, qq ($J=7,7$)	32,7/ CH	32,8
9	0,99, d ($J=7,0$)	0,97, d ($J=7,0$)	17,6/ CH_3	17,6
10	0,96 d ($J=7,0$)	0,96, d ($J=7,0$)	17,6/ CH_3	17,6
Solvente	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3	CDCl_3

* AHMED (2000)

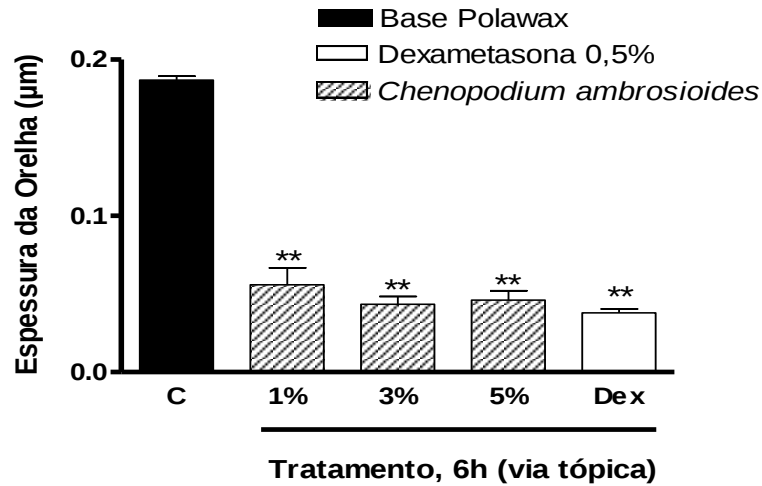
** CAVALI et al.(2004)

5.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória

5.2.1 Edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos

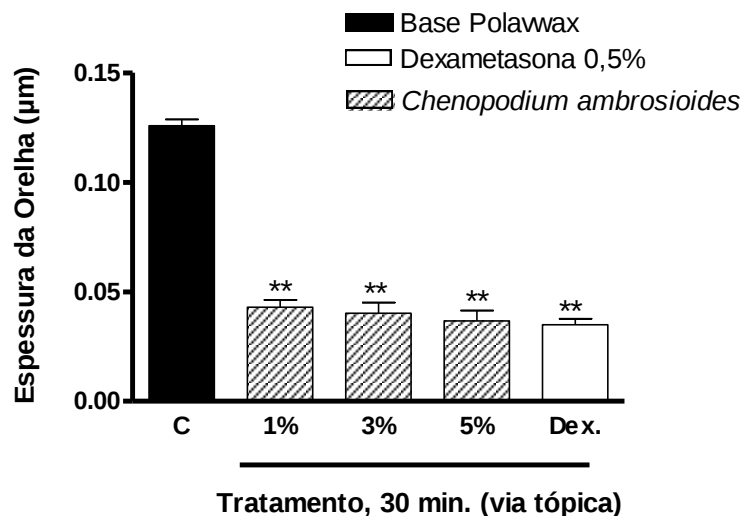
Na figura 17 estão representados os resultados obtidos com o creme contendo EEB de *C. ambrosioides* no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. O edema de orelha foi reduzido pelo pré-tratamento dos animais com o EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* em todas as concentrações utilizadas de forma significativa ($F_{(4,25)} = 104,6$ / $p < 0,01$) quando comparado com o grupo controle (base polawax). Neste experimento, as IMs calculadas para as concentrações de 1, 3 e 5% do EEB foram, respectivamente, 73,52; 79,44 e 78,09% e para dexametasona foi de 81,97%.

Figura 17. Efeito inibitório do creme a base do extrato etanólico bruto (EEB) obtido de *C. ambrosioides* (1, 3 e 5 %) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (2,5%/orelha) em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras o Erro Padrão Médio (EPM). Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (**p<0.01). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



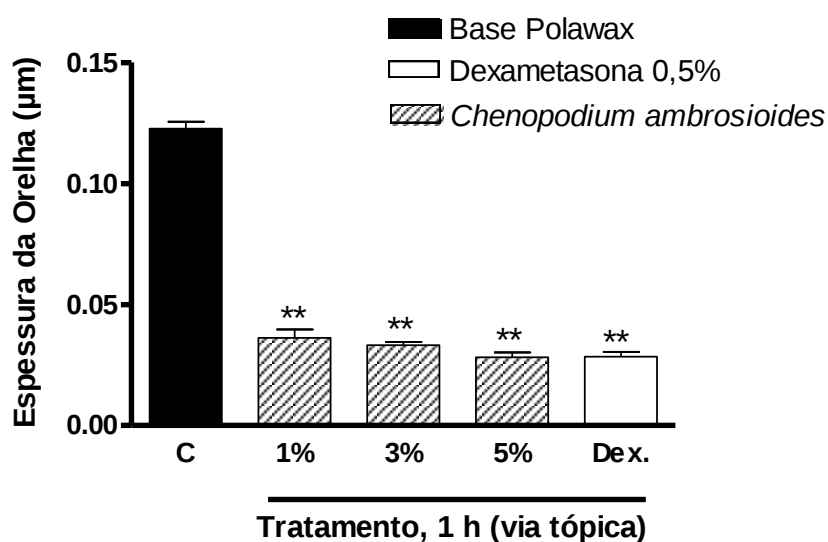
No edema de orelha induzido por CAP verificou-se que os animais pré-tratados com o creme contendo EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* tiveram redução do edema de forma significativa ($F_{(4,25)} = 106,6$ / $p < 0,01$), quando comparado com controle (base polawax). As IMs calculadas para as doses de 1, 3, 5 % e dexametasona foram, respectivamente, 65,81; 68,07; 70,85 e 72,18% (Figura 18).

Figura 18. Efeito inibitório do creme a base do EEB de *C. ambrosioides* (1,3 e 5 %) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por CAP 250 µg/orelha em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMs. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (**p<0.01). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



Também foi observado que a aplicação tópica do creme contendo EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides*, foi capaz de inibir de forma significativa ($F_{(4,25)} = 272,4 / p < 0,01$) o edema de orelha induzido por AA, quando comparado com controle (base polawax). As IMs calculadas para as concentrações de 1, 3 e 5% foram, respectivamente, 70,49; 72,94 e 77,02%. Neste experimento, observou-se que a inibição do edema pela dexametasona 0,5% com IM calculada de 76,75% foi semelhante ao do creme com extrato a 5% (Figura 19).

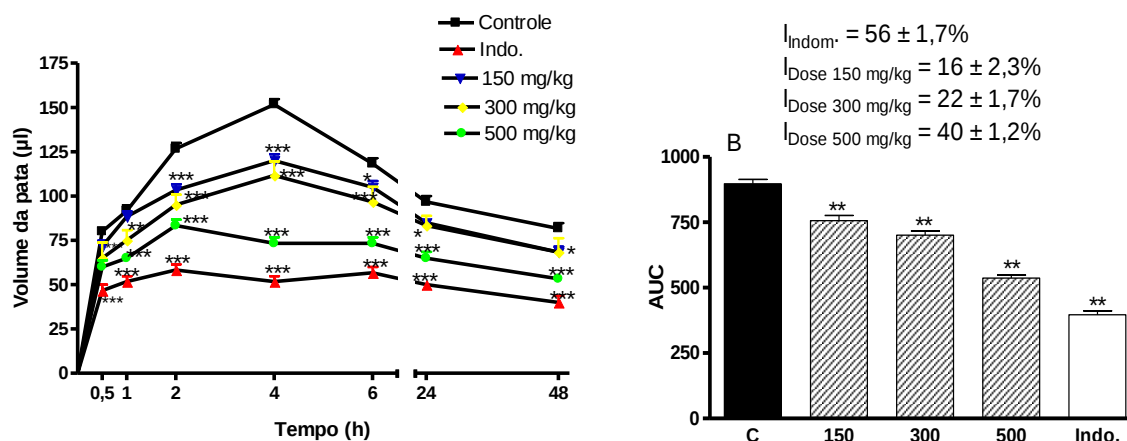
Figura 19. Efeito inibitório do creme a base do EEB obtido de *C. ambrosioides* (1, 3 e 5%) e dexametasona (0,5%) sobre o edema de orelha induzido por AA 2 mg/orelha em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (** $p < 0,01$). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



5.2.2 Edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos

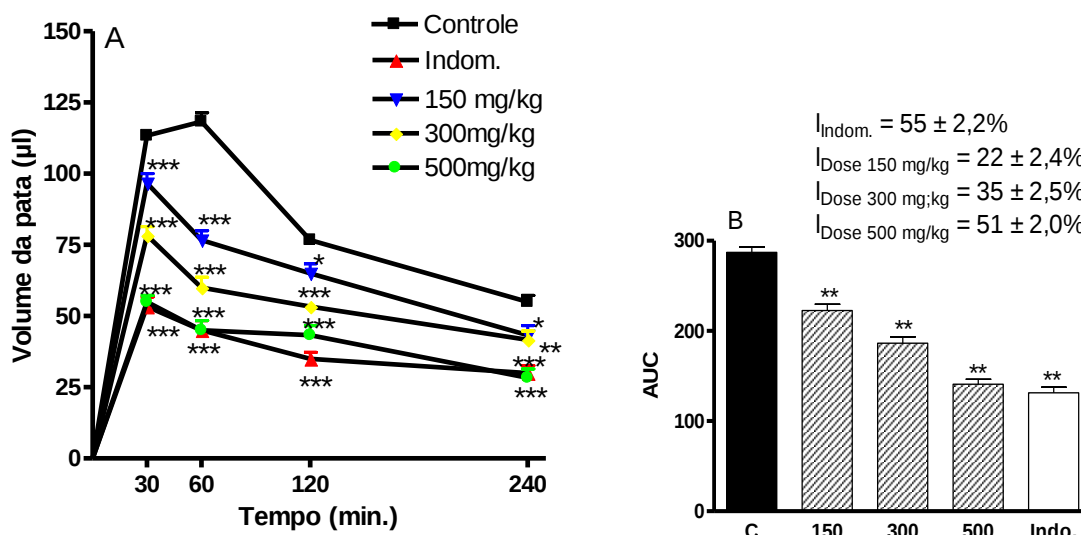
Conforme a figura 20 (A e B), o pré-tratamento dos animais com o EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides* apresentou inibição nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg. Através do cálculo da área sob a curva (AUC) verificou-se redução de forma dose-dependente do edema de pata induzido por Cg ($F_{(4,24)} = 9,58 / p < 0,01$), quando comparado com o controle, com IMs calculadas, respectivamente, de 16, 22 e 40%. No experimento também foi observado o efeito antiedematogênico da indometacina, com IM de 56%.

Figura 20. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre o edema de pata induzido por Cg 300 µg/pata em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (*p<0.05, **p<0.01). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Valores expressos em média ± SEM (µl/pata). (**p<0,01). Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett quando comparadas ao grupo controle (salina).



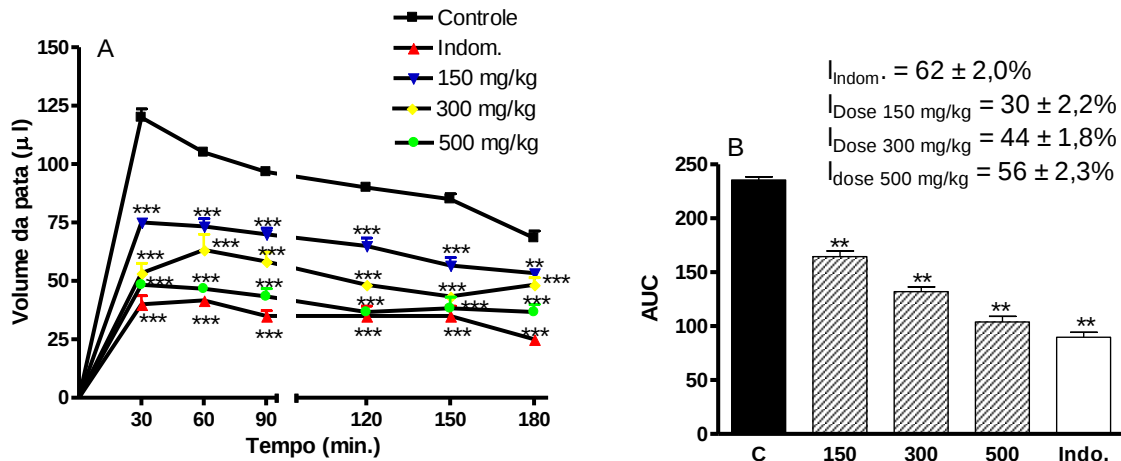
Os resultados obtidos no edema de pata induzido por PGE₂ estão demonstrados na figura 21 (A e B). Pode ser observado que o EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides* aos 30 minutos após a indução do edema, apresentou inibição nas doses de 150, 300 e 500 mg/Kg. Sendo tais doses eficazes em promover redução do edema induzido pela PGE₂ em todos os tempos avaliados. Quando se representa os efeitos do extrato através da AUC, verificou-se que o extrato promoveu efeito antiedematogênico de forma dose-dependente e estatisticamente significativa ($F_{(4,12)} = 10,92$ / $p < 0,01$), com IMs calculadas de 22, 35 e 51%, respectivamente.

Figura 21. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre o edema de pata induzido por PGE_2 3 nmol/pata em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Valores expressos em média $\pm$ SEM ($\mu\text{l/pata}$). (** $p < 0,01$). Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett quando comparadas ao grupo controle (salina).



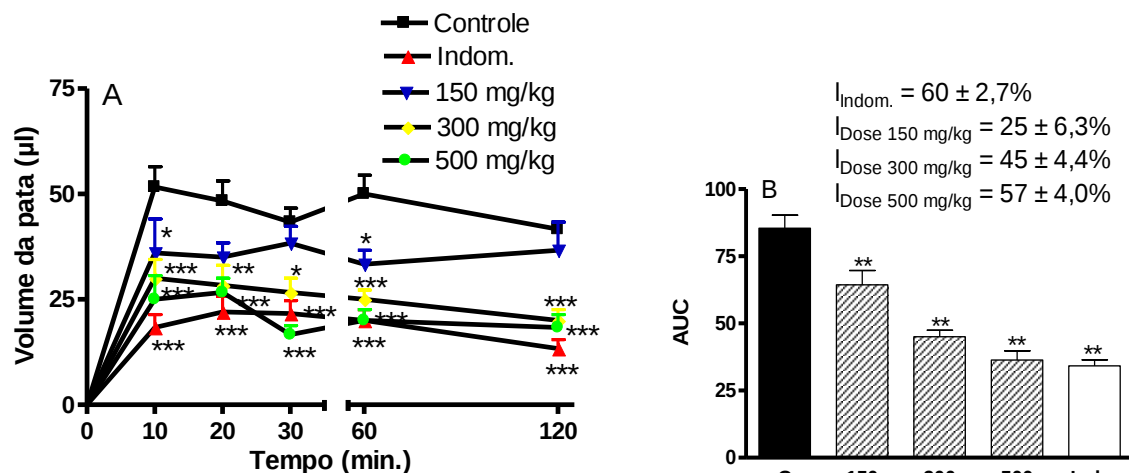
Os resultados obtidos no edema de pata induzido por SP estão demonstrados na figura 22 (A e B). Neste experimento, o EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides* promoveu inibição significativa aos 30 minutos, após a indução do edema, nas doses de 150, 300 e 500 mg/Kg. Observa-se também que à partir de 60 minutos após a aplicação da SP houve redução significativa do edema (em todas as doses utilizadas). Através do cálculo da AUC verificou-se que o perfil de inibição do edema, induzido por SP foi dose-dependente, com IMs calculadas de 30, 44 e 56%, respectivamente, e estatisticamente significante ($F_{(4,20)} = 4,05$ / $p < 0,01$). Foi verificado que a dose de 500 mg/kg, promoveu efeito (56%) antiedematogênico, semelhante à indometacina (62%).

Figura 22. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre o edema de pata induzido por SP 20 nmol/pata em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Valores expressos em média $\pm$ SEM (μ l/pata). (** $p < 0,01$). Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett quando comparadas ao grupo controle (salina).



Na figura 23 A no edema induzido por BK verificou-se o efeito antiedematogênico do EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides*. Neste experimento foi observado redução significativa do edema aos 10 minutos posterior a sua indução, em todas as doses testadas. Na figura 23 B observa-se efeito dose-dependente e significativo ($F_{(4,16)} = 0,58$ / $p < 0,01$) do extrato, com IMs calculadas de 25, 45 e 57%. Novamente, foi observado que a dose maior utilizada nos experimentos promoveu efeito (57%) semelhante ao do controle positivo, indometacina (60%).

Figura 23. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre o edema de pata induzido por BK 3 nmol/pata em camundongos. Cada ponto representa a média de 6 animais. Asteriscos denotam diferenças estatísticas quando comparados com o controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. Valores expressos em média $\pm$ SEM (μ l/pata). (** $p < 0,01$). Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett quando comparadas ao grupo controle (salina).



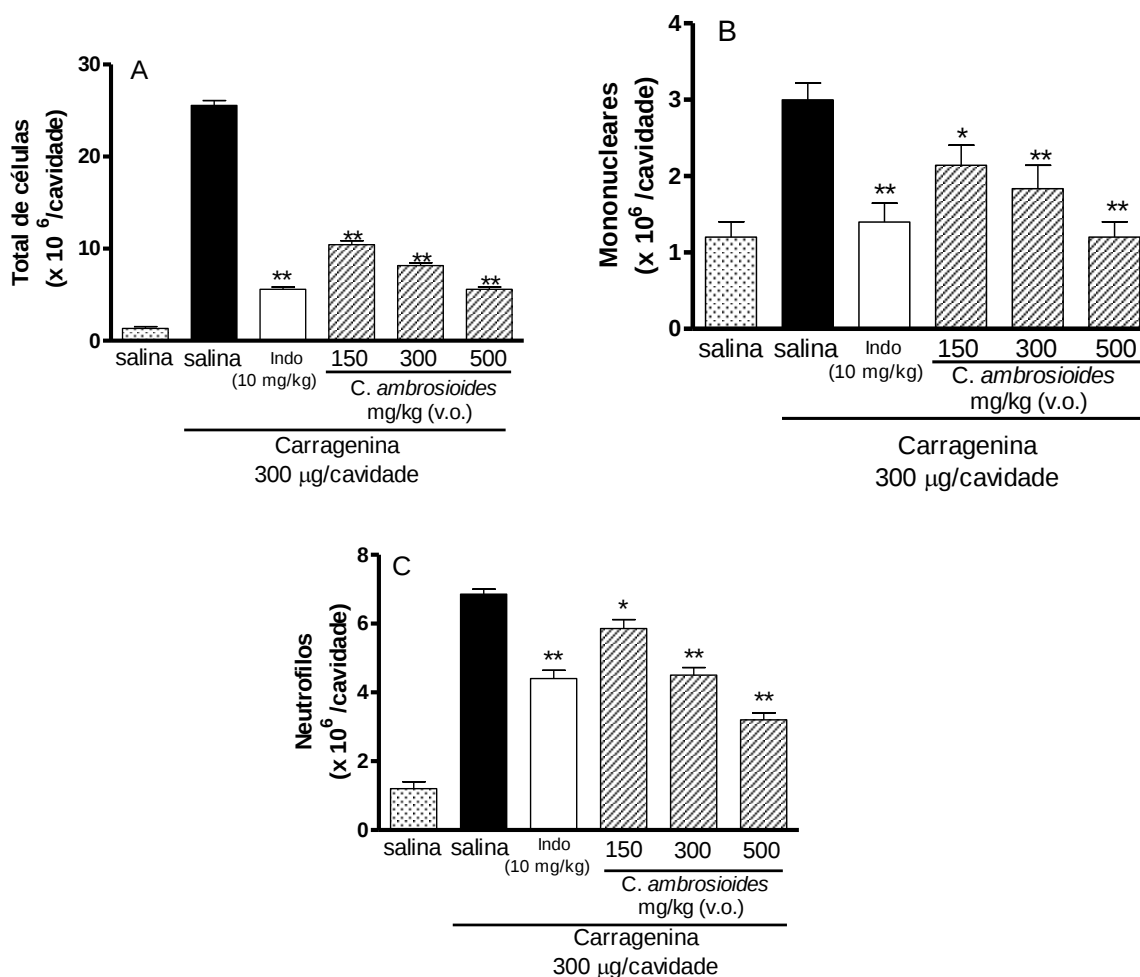
5.2.3 Pleurisia induzida por Cg

No modelo de pleurisia induzida por Cg (Figura 24 A), o pré tratamento dos animais, com o EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides*, foi efetivo em inibir significativamente a migração leucocitária de forma dose-dependente ($F_{(5,36)} = 643,8$ / $p < 0,01$), quando comparado com o grupo controle negativo (salina / carragenina). As IMs calculadas foram de 59, 68 e 78% para as doses de 150, 300 e 500 mg/Kg, respectivamente, enquanto que o grupo pré tratado com indometacina, apresentou IM de 78%.

Avaliando o efeito dos tratamentos sobre as células mononucleares (Figura 24 B). Foi possível observar que o extrato causou diminuição no número deste tipo celular, notadamente, em relação ao controle, de forma dose-dependente ($F_{(5,36)} = 9,86$ / $p < 0,01$). As IMs calculadas para o experimento foram de 30, 40 e 60% para as doses de 150, 300 e 500 mg/Kg, respectivamente. A DI_{50} calculada foi de 375,97 (256,09 – 551,97) mg/Kg.

Ainda com relação ao tipo de célula leucocitária envolvida no processo inflamatório, foi verificado que o EEB de *C. ambrosioides* produziu de forma significativa e dose dependente, a redução do número de neutrófilos ($F_{(5,36)} = 102,9$ / $p < 0,01$) (Figura 24 C), com IM calculadas de 15%, 34 % e 53%, respectivamente, para as doses de 150, 300 e 500 mg/Kg. A DI_{50} calculada foi de 468,12 (256,09 – 551,97) mg/Kg.

Figura 24. Efeito da administração oral do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150-500 mg/Kg) e indometacina (10 mg/kg) sobre os eventos da pleurisia induzida por Cg. A- leucócitos totais, B- mononucleares e C- neutrófilos. Coluna pontilhada - animais que recebeu água destilada + Tween por via oral / salina intrapleurar; coluna negra - animais que recebeu água destilada + Tween por via oral / carragenina 1% intrapleurar; colunas rachuradas- animais tratados via oral com doses diferentes do EEB de *C. ambrosioides* / carragenina intrapleurar e coluna branca- animais que recebeu Indometacina 10 mg/Kg, via oral / carragenina intrapleurar. Asteriscos denotam significância estatística quando comparados com o controle (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). ANOVA, seguido de teste de Dunnett.



5.2.4 Atividade da mieloperoxidase (MPO) e enzima adenosina-deaminase (ADA), sobre os níveis de produção de óxido nítrico e TNF- α

Na figura 25 estão representados os resultados obtidos relativos aos efeitos do EEB sobre as atividades das enzimas MPO, ADA, NO e TNF- α .

Os resultados demonstraram que o tratamento dos animais com o EEB das folhas e caules de *C. ambrosioides* nas doses de 300 e 500 mg/kg produziram a

inibição da atividade da MPO (31% e 62,22%) de forma estatisticamente significativa ($F_{(5,18)} = 28,34 / p < 0,001$) (figura 25 A).

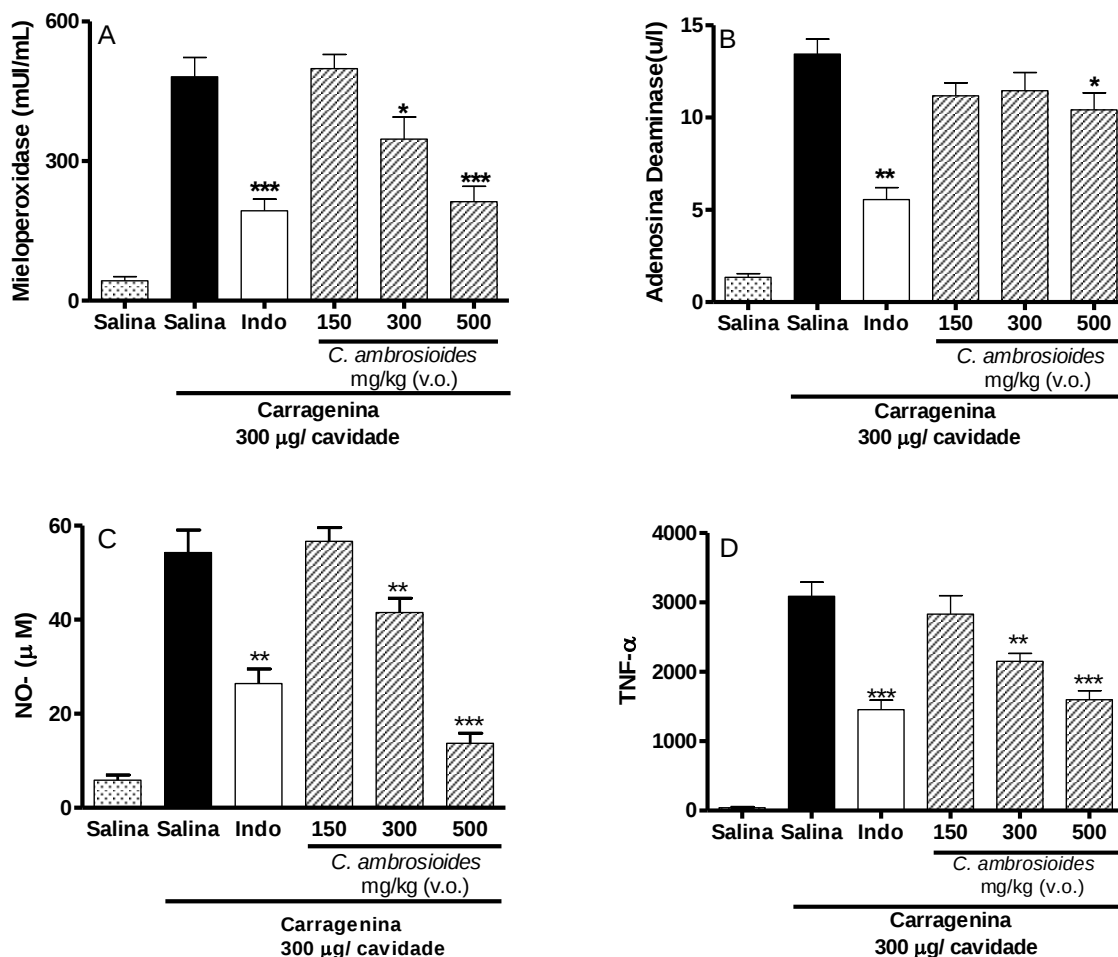
Quando foi avaliado o efeito do EEB sobre a atividade da ADA (Figura 25 B), verificou-se que somente a dose de 500 mg/kg produziu uma diminuição da atividade da enzima de forma branda (23,07%), porém estatisticamente significativa ($F_{(5,18)} = 35,55 / p < 0,05$).

Os níveis do NO (Figura 25 C) também foram medidas neste experimento, no qual foi observado que o tratamento dos animais com o extrato da planta na dose de 300 e 500 mg/kg, promoveram diminuição de forma estatisticamente significativa. Embora a dose de 300 mg/kg tenha promovido uma pequena diminuição dos níveis de NO (25,92%). Na dose de 500 mg/kg a diminuição foi significativa (77,77%) ($F_{(5,24)} = 47,32 / p < 0,001$).

Finalmente, a figura 25 D representa os resultados obtidos referentes ao efeito do tratamento do EEB sobre a atividade do TNF- α . Os resultados demonstraram que as doses de 300 e 500 mg/kg, reduziram os níveis de TNF- α de forma significativa ($F_{(5,18)} = 45,45 / p < 0,001$) em 33,33 e 50,0%, respectivamente, quando comparado com o controle.

Os animais submetidos ao tratamento com indometacina também apresentaram inibição nas atividades da MPO (66,8%), ADA (61,53%), NO (59,25%) e TNF- α (53,33%) ($p < 0,001$, $p < 0,001$).

Figura 25. Efeitos de diferentes doses do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150-500 mg / kg, po) em inflamação induzida por Cg (1%) no modelo de pleurisia. Efeitos do EEB sobre a atividade da MPO (A), atividade da ADA (B), níveis de NO (C) e produção de TNF- α (D). Sal = controle (animais tratados somente com solução salina estéril), Cg = animais tratados com carragenina, Indo = animais tratados com indometacina (10 mg / kg, v.o.). Cada grupo representa a média de 8-10 animais. Diferenças significativas determinadas pelo método ANOVA, complementado pelo de Newnan-Keuls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparado com Cg.



5.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

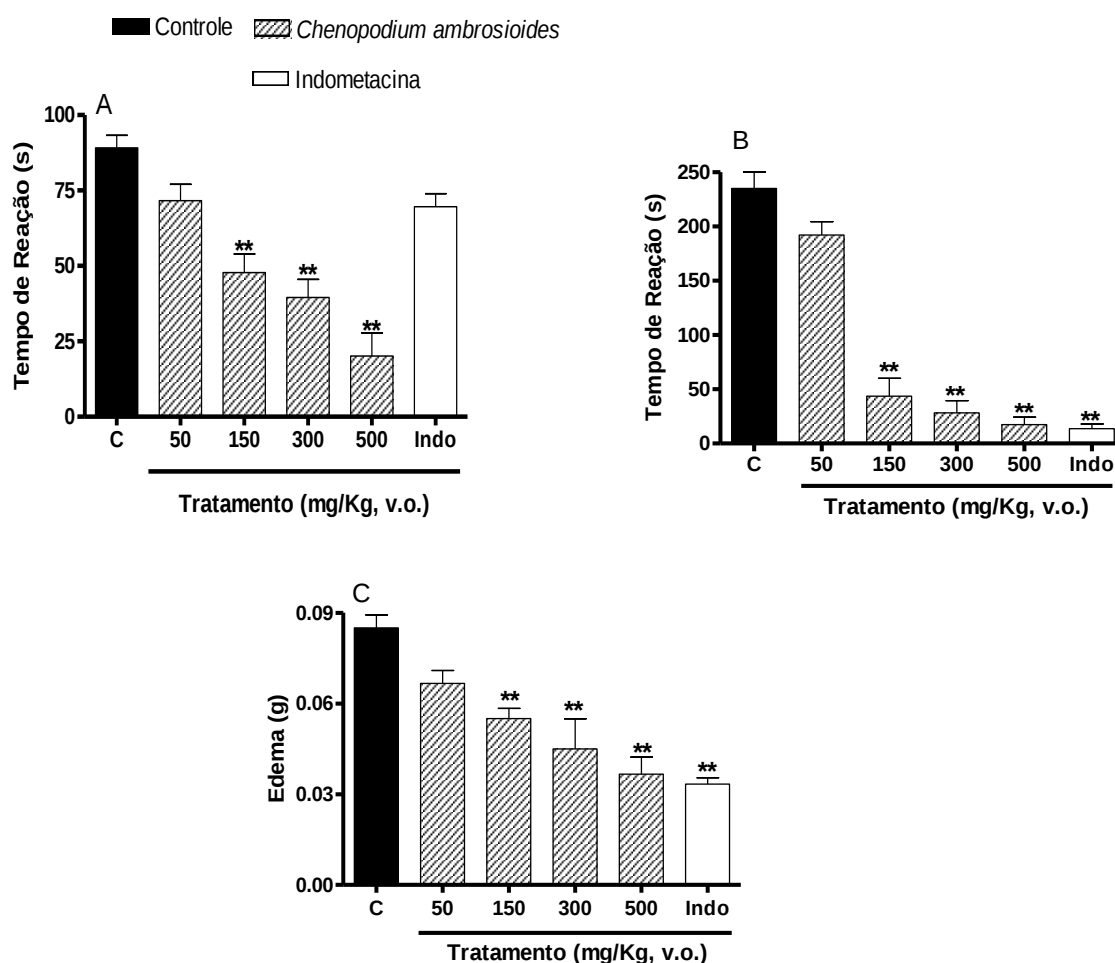
5.3.1 Nocicepção induzida por Formalina

Nas duas fases do processo doloroso induzido por formalina (2,5%), o tratamento dos animais com EEB da planta em estudo (nas doses de 150, 300 e 500 mg/Kg), reduziu de maneira significativa a nocicepção induzida pela formalina, representado pela diminuição do tempo de reação dos animais frente ao estímulo doloroso. As IMs calculadas foram de 46,35; 55,69 e 77,39%, respectivamente, na

primeira fase (dor neurogênica) e 81,64; 88,02 e 95,60% na segunda fase (dor inflamatória) (Figura 26 A e B). A DI_{50} calculada para o experimento foi de 284,19 (184,45 – 437,87) mg/Kg para a 1ª fase, não sendo possível o cálculo para a segunda fase, porque a IM foi superior a 50%.

Também foi observado através deste experimento, que o efeito antiedematogênico do EEB se repete (Figura 26 C). EEB reduziu de forma significativa ($p<0,01$) os edemas nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg, com inibições de 35,29; 47,06 e 57,64%, respectivamente. No experimento, a indometacina produziu inibição do processo doloroso na fase inflamatória (94,19%) e também inibiu a formação do edema (61,17%).

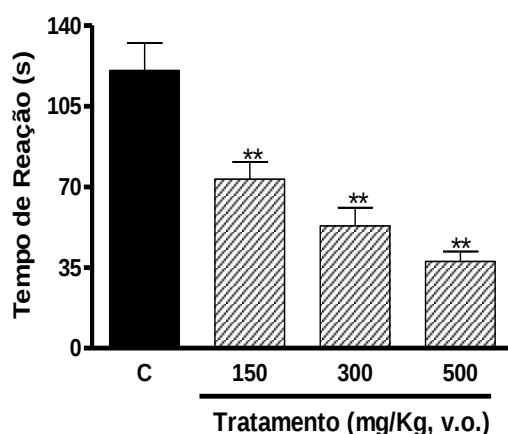
Figura 26. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (50, 150, 300 e 500 mg/Kg, v.o) e indometacina (10 mg/Kg, v.o), sobre a (A) fase neurogênica (0-5'), (B) fase inflamatória (15-30') e (C) edema, induzidos por formalina. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam significâncias estatísticas (** $p<0,01$) quando comparados com controle. Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnet.



5.3.2 Nociceção induzida por PGE₂

No modelo de dor induzida por PGE₂ (Figura 27), todas as doses do EEB utilizadas produziram efeito antinociceptivo nos animais com perfil farmacológico de dose-dependência ($F_{(3,20)} = 18,58$ / $p < 0,01$). As IMs calculadas para o experimento foram de 39, 56 e 68%, respectivamente. A DI₅₀ calculada foi de 298,11 (260,55 – 341,09) mg/Kg.

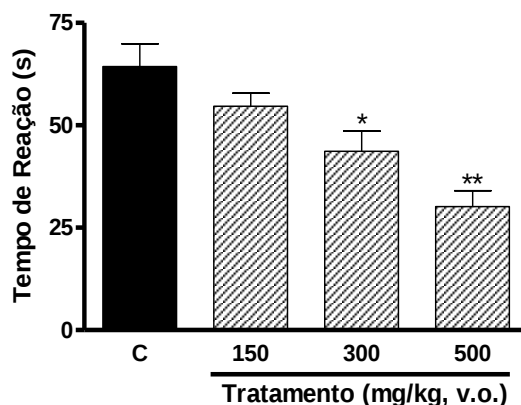
Figura 27. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/Kg, v.o) sobre a resposta nociceptiva induzida por PGE₂ em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam significâncias estatísticas (** $p < 0,01$) quando comparados com controle. ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



5.3.3 Nociceção induzida por Capsaicina

A Figura 28 representa os resultados dos efeitos do EEB sobre a nociceção induzida por CAP. Nos animais pré-tratados com o EEB, foi observado uma redução da resposta álgica induzida pela capsaicina nas doses de 300 e 500 mg/Kg, ($F_{(3,20)} = 10,79$ / $p < 0,01$), sendo a IMs calculadas de 32 e 53%, respectivamente. A DI₅₀ calculada para este experimento foi de 470,33 (335,82 – 658,72) mg/kg.

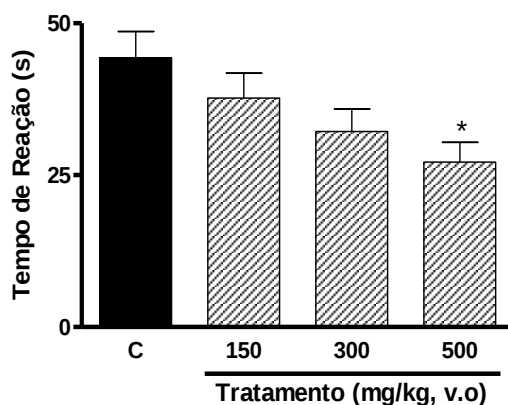
Figura 28. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150, 300 e 500 mg/Kg, v.o), sobre a resposta nociceptiva induzida por CAP em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam significâncias estatísticas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) quando comparados com controle. Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



5.3.4 Nocicepção induzida por Bradicinina

No modelo de nocicepção induzida por BK (Figura 29) o pré-tratamento dos animais com EEB da planta em estudo também foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida pela BK. Entretanto, esse efeito foi observado somente com a maior dose testada ($F_{(3,20)} = 3,65$ / $p < 0,05$). A inibição obtida foi de 38% e a DI_{50} calculada foi de 508,37 (410 – 630,34) mg/kg.

Figura 29. Efeito do EEB obtido de *C. ambrosioides* (150,300 e 500 mg/kg, v.o.) na nocicepção induzida por BK em camundongos. Cada coluna representa a média de 6 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam significâncias estatísticas (* $p < 0,05$) quando comparados com controle. Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Dunnett.



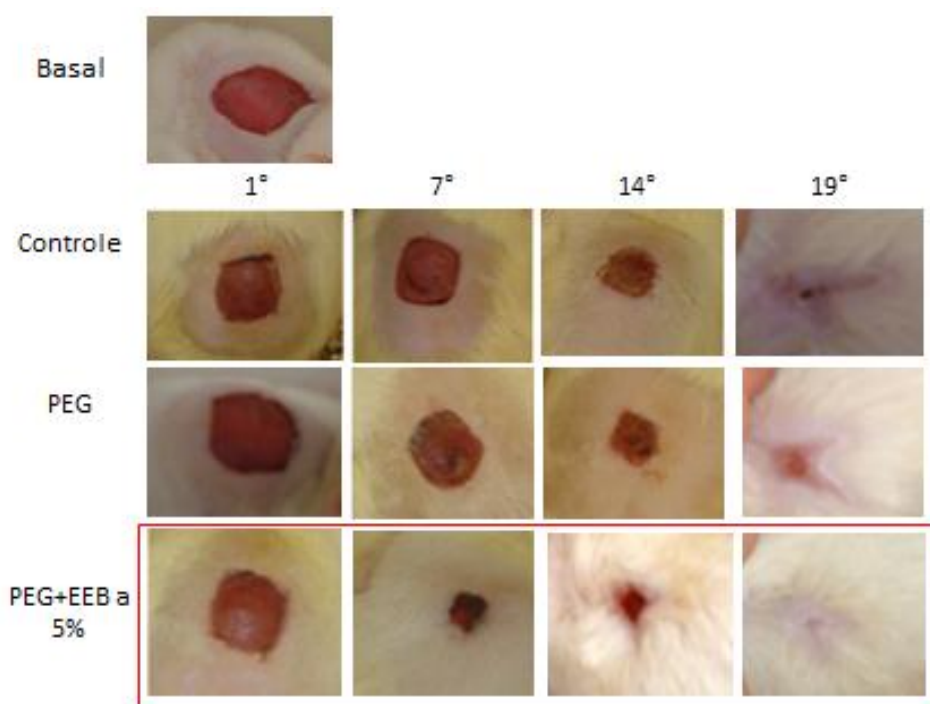
5.4 Avaliação da atividade cicatrizante

5.4.1 Indução do processo ulcerativo (cicatrização cutânea)

Para verificar a possível atividade cicatrizante tópica do EEB de *C. ambrosioides*, foi realizado o modelo de cicatrização cutânea em ratos, utilizando a formulação de base PEG (polietilenoglicol). Nos animais foram testados as concentrações do extrato de 1, 3 e 5%, no entanto somente foi demonstrado os resultados do grupo PEG+EEB a 5%.

A figura 30 que ocorreu uma evolução do processo de cicatrização de todos os grupos testados experimentalmente. Porém, a melhor resolução da cicatriz é observada no grupo PEG+EEB a 5%.

Figura 30. Análise macroscópica representativa das lesões cutâneas dos animais no 1, 7, 14 e 19 dias de tratamento diário com PEG base e pomada de EEB a 5% a partir da lesão. Ratos Wistar machos (n=5/grupo) foram submetidos à única lesão incisional de 20 mm.



Observadas macroscopicamente (Figura 30) no primeiro dia do experimento, após a hemóstase do processo cicatricial, as lesões apresentaram bordas bem definidas, não apresentando sinais de inflamação, mas apenas um pequeno edema. Através das imagens, no sétimo dia observou-se claramente que os animais tratados com pomada do extrato de *C. ambrosioides*, em todas as concentrações utilizadas (dados não mostrados) apresentaram diminuição do edema, redução do tamanho da lesão e formação de tecido de granulação, comparando-se com grupos PEG branco e controle negativo.

No decimo-quarto dia do tratamento, as lesões já apresentavam grandes sinais de melhora, com cicatrização acentuada e crescimento de pelos ao redor da incisão. No décimo-nono dia, embora seja observado que o grupo que recebeu a pomada com EEB tenha tido uma total recuperação do tecido cutâneo antes dos demais grupos, esse dado não foi considerado estatisticamente significativo.

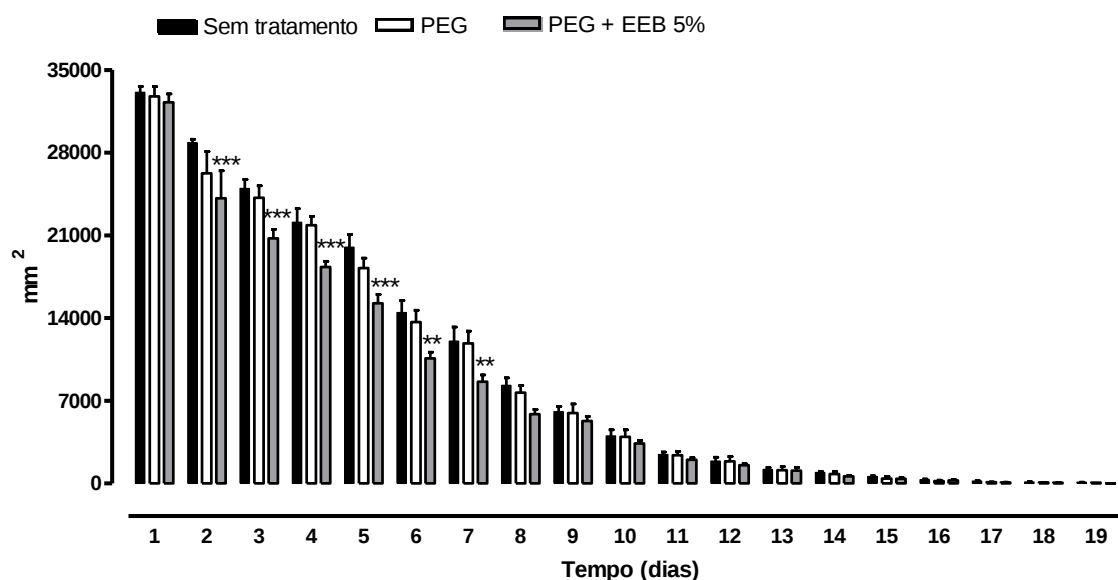
A Tabela 4 ilustra com mais clareza a área de cicatrização em função do tempo (dias) das lesões após os diferentes tratamentos. Os dados indicam que a de cicatrização ocorreu de forma proeminente foi maior nos primeiros dias após a aplicação da pomada. Ao final do tratamento verificou-se que houve diferença significativa entre o grupo PEG+EEB 5% em relação ao sem tratamento (controle).

Tabela 4. Evolução da cicatrização dos animais submetidos à lesão cutânea dorsal nos dias 1,7,14 e 18 após tratamento diário com pomada de EEB a 5%.

Tempo (dias) (%)	1	7	14	19
Controle	100	66,08	30,01	3,14
PEG	100	65,88	28,82	2,23
PEG+EEB 5%	100	55,29**	26,49	1,22

A figura 31 mostra redução gradativa do tamanho da ferida ao longo do tratamento. Observou-se que comparando ao controle (animais sem tratamento) o grupo PEG+EEB 5%, teve redução estatisticamente significativa até o 7° dia de tratamento.

Figura 31. Efeito do EEB de *C. ambrosioides* 5% em formulações farmacêuticas usando como base polietilenoglicol (PEG) sobre a evolução da cicatrização cutânea em ratos. Cada coluna representa a média de 5 animais e as barras os EPMS. Asteriscos denotam significâncias estatísticas (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$) quando comparados com sem tratamento (controle). Foi realizado ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.



5.5 Modelos adicionais

5.5.1 Efeito sobre a performance motora (rota-rod)

Conforme a tabela 5, o tratamento oral com o EEB obtido de *C. ambrosioides* nas doses de 150, 300 e 500 mg/kg, não foi capaz de afetar de modo significativo o tempo de permanência no aparelho dos animais testados no modelo de rota-rod, quando comparado com o grupo controle.

Tabela 5. Efeito do tratamento do EEB obtido de *C. ambrosioides* sobre a performance motora dos animais avaliados no teste rota-rod.

Grupos	Dose (mg/Kg)	Tempo de Permanência (s) 60 s				
		Período de Observação				
		0	30	60	120	180
Controle	0	60	51,0±4,3	52,8±4,8	52,2±3,2	48,6±5,6
EEB	150	60	49,6±5,3	52,0±4,9	48,4±3,7	50,0±3,4
EEB	300	60	54,2±3,7	53,0±3,4	52,6±4,8	51,0±5,6
EEB	500	60	53,4±3,0	51,0±4,1	50,2±5,3	48,6±5,6

Valores foram expressos em média ± E.P.M. de 5 animais em cada grupo. ANOVA seguido do teste Dunnet, quando comparados ao grupo controle (salina).

5.5.2 Medida da temperatura retal

Como ilustrado na tabela 6, comparando-se com o grupo controle, o tratamento oral dos animais com o EEB de *C. ambrosioides* também não produziu alterações significativas na temperatura corporal dos animais quando avaliados, 60 min após o tratamento.

Tabela 6. Efeito do tratamento do EEB obtido de *C. ambrosioides* na medida de temperatura retal dos animais avaliados.

Grupos	Dose (mg/Kg)	Período de Observação				
		0	30	60	120	180
		0	30	60	120	180
Controle	0	35,2±0,2	35,3±0,2	35,8±0,2	35,4±0,4	36,2±0,2
EEB	150	35,6±0,2	35,1±0,1	35,7±0,3	35,6±0,2	36,2±0,2
EEB	300	35,7±0,2	35,3±0,1	36,0±0,4	35,6±0,2	35,8±0,3
EEB	500	35,4±0,2	35,4±0,2	35,6±0,3	35,8±0,2	36,0±0,2

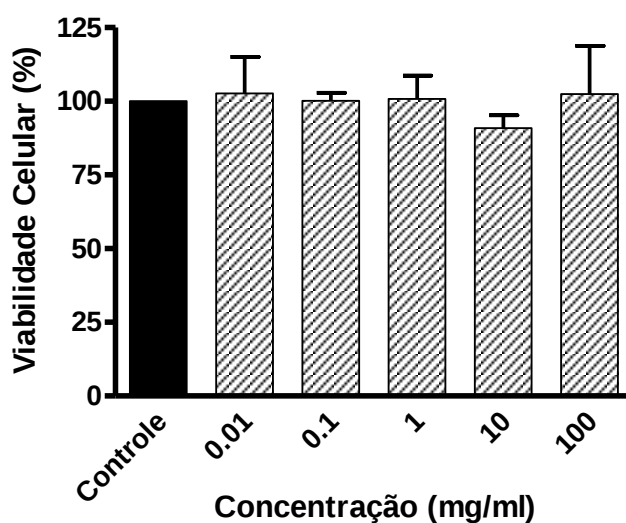
Valores foram expressos em média ± E.P.M. de 5 animais em cada grupo. ANOVA seguido do teste Dunnet quando comparados ao grupo controle (salina).

5.6 Avaliação da citotoxicidade

5.6.1 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

Considerando os testes já realizados, o teste *in vitro* de viabilidade celular foi utilizado como estratégia para avaliação da viabilidade celular de células L929 frente a diferentes concentrações do EEB da planta em estudo. Os resultados demonstraram que o EEB não reduziu a viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas, quando comparadas ao controle negativo, apresentando Cl_{50} ($>100\text{mg/mL}$) (Figura 32).

Figura 32. Viabilidade das células L929 expostas ao EEB obtido de *C. ambrosioides* utilizando como controle negativo meio MEM na concentração de zero mg/mL, incubadas por 24 horas a 37 °C em 5% CO_2 . Cada coluna representa a média $\pm$ desvio padrão. ANOVA seguido de TUKEY.



6 DISCUSSÃO

A *Chenopodium ambrosioides* é uma planta amplamente utilizada pela população brasileira e em diversas regiões da América do Sul para fins terapêuticos. Em fevereiro de 2009, o Ministério da Saúde divulgou a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), onde consta a planta em estudo. A planta já apresenta algumas atividades farmacológicas comprovadas como: atividade antitumoral (NASCIMENTO et al., 2006), antifúngica (JARDIM et al., 2008), cicatrização de úlceras causadas por espécies de *Leishmania* (PATRÍCIO et al., 2008), atividade anti-inflamatória, analgésica (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007) e antipirética (HALLAL et al., 2010).

Entretanto, apesar da existência de um trabalho sobre o assunto, ainda há carência de estudos que comprovem o uso popular desta planta no tratamento da inflamação e da dor aguda. Por conta desse fato em nosso laboratório, nos propusemos a estudar a *C. ambrosioides* farmacológica e fitoquimicamente.

A extração dos metabólitos secundários foi realizada através da preparação de extrato etanólico das folhas e caules através do processo de maceração. Utilizou-se a maceração por utilizar solvente a frio, o que impede a decomposição dos metabólitos secundários extraídos e garante a extração de substâncias que são consideradas princípios ativos.

No processo extrativo as folhas apresentaram um melhor rendimento em relação ao caule, conforme pode ser observado na tabela 1(pg.80). Um dos fatores que pode ser considerado para justificar as diferenças de massa entre as partes analisadas é a rigidez dos tecidos que compõem cada órgão vegetal, facilitando ou não a penetração do solvente. Quanto maior a fragmentação do material vegetal, maior será a superfície de contato e maior será o poder de penetração do solvente para a dissolução dos princípios ativos vegetais. Consequentemente, maior será o rendimento do processo extrativo (COSTA et al., 2005). Nesse trabalho não se determinou o tamanho das partículas das folhas e caules, mas as folhas, por serem mais maleáveis foram mais trituradas. Isto também pode ter contribuído para os melhores rendimentos das folhas.

O fracionamento do extrato etanólico das folhas e caules se deu por cromatografia em coluna para a separação e isolamento das substâncias. A CC é

uma técnica muito simples, de baixo custo e que permite o isolamento de substâncias em maior concentração nos extratos (CAO et al., 2010).

As substâncias isoladas foram identificadas por RMN. Esta técnica é muito útil para análises de substâncias naturais, pois quase todas as moléculas solúveis podem ser determinadas devido à resposta molecular (MALET-MARTINO; HOLZGRABE, 2011). Neste estudo, através da análise de RMN foi possível identificar a estrutura de dois monoterpenos do extrato das folhas e caules, o ascaridol (**1**) e o 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano (**10**).

O ascaridol é a substância mais abundante na planta *Chenopodium*, ele foi obtido como principal componente do óleo essencial de *C. ambrosioides* (CAVALLI et al., 2004). Outras espécies do gênero também têm como um dos principais componentes o ascaridol, estas são: *C. murale*, *C. foliosum*, *C. missouriense*, *C. opulifolium*, *C. polyspermum*, *C. vulvaria*, *C. ambum* (DEMBITSKY; SHKROB; HANUS, 2008; DEMBITSKY, 2008).

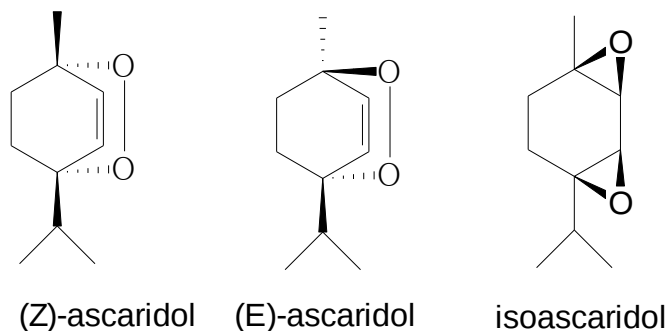
O ascaridol pode ser encontrado em duas formas isoméricas, o (Z)-ascaridol e o (E)-ascaridol. O (Z)-ascaridol parece ser mais abundante, ele foi obtido em 61,4% do óleo essencial de *C. ambrosioides*, enquanto o (E)-ascaridol foi obtido em 18,6% (JARDIM et al., 2008). Os dados de RMN encontrados na literatura não informam a estereoquímica para os dois isômeros. Por isso se faz necessário outras técnicas de RMN bidimensionais na tentativa de identificar corretamente o isômero isolado.

Já o 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano foi isolado, até o momento, do extrato das folhas de *C. ambrosioides* por cromatografia em coluna (AHMED, 2000) e no óleo essencial de *C. ambrosioides* (CAVALLI et al., 2004).

Além dos dois monoterpenos identificados na espécie em estudo, também foram isolados outros compostos, ainda não identificados, que pertencem à classe dos terpenoides. No gênero *Chenopodium* outros monoterpenos foram encontrados como isoascaridol, p-cimeno, cis-p-menta-2-8-die-1-ol, 1,4-dihidroxi-p-menta-2-eno, α -terpineno, carvacrol, limoneno e timol (CAVALLI et al., 2004; JARDIM et al., 2008; DEMBITSKY; SHKROB; HANUS, 2008).

Existe controvérsia quanto à produção do isoascaridol pela *Chenopodium*, pois este pode ser obtido como um produto da isomerização do ascaridol por aquecimento. Durante a análise do óleo essencial de *C. ambrosioides* por cromatografia a gás com aquecimento a 150 °C observou-se a presença do

ascaridol e isoascaridol. Porém, quando as mesmas amostras foram avaliadas por RMN ^{13}C , somente o ascaridol foi detectado. Isto indica que o ascaridol é um composto sensível ao aquecimento e pode levar a formação do isômero. Este fenômeno pode levar a quantificação errônea do ascaridol em amostras de óleos essenciais (CAVALLI et al., 2004).



Um estudo realizado com *C. ambrosioides* detectou a presença de outros metabólitos como os flavonoides e alcaloides, mas CCD feita com o extrato das folhas e caules utilizando como revelador solução de cloreto férrico 3%, mostrou que a planta em estudo não apresentou estes constituintes, predominando os terpenos. Isso pode ser explicado por fatores sazonais, disponibilidade hídrica, temperatura e altitude (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

No presente trabalho, o extrato etanólico obtido das folhas e caules *C. ambrosioides* (EEB) foi testado em ensaios farmacológicos, resultando em efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e cicatrizantes.

Num primeiro momento procurou-se verificar o efeito do EEB sobre o processo inflamatório, uma vez que a planta é utilizada popularmente em processos inflamatórios sistêmicos e tópicos. O primeiro teste farmacológico utilizado para tal objetivo foi o edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos, como o óleo de cróton, o AA e a CAP. O modelo de edema de orelha é utilizado na triagem de substâncias anti-inflamatórias de uso tópico. O edema de orelha induzido por óleo de cróton é um modelo amplamente utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos que atuam na fase aguda da inflamação, bem como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÀBOR, 2003). Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das PG e LT, atuando em enzimas-chave na cascata de biossíntese desses mediadores,

respectivamente COX e LOX. Além disso, compostos com atividade de *corticóide-like* são sensíveis a esse modelo (TERRACIANO et al., 2006).

A aplicação tópica do óleo de cróton (composto 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, conhecido como TPA), induz uma resposta inflamatória aguda, caracterizada por vasodilatação, infiltração de leucócitos e polimorfonucleares no tecido e formação de edema já nas primeiras duas horas do processo, seguido do aumento da espessura da orelha como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, retornando aos valores basais após 24 horas de indução (YOUNG; WAGNER; SPIRES, 1983; ANDÚJAR et al., 2010).

O mecanismo pelo qual o óleo de cróton exerce seu efeito é pela ativação da PKC, bem como da ativação sequencial da via da MAP quinase, PLA₂, indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX. Por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatório (eicosanóides e citocinas), onde a PGE₂, IL-1 β e TNF- α seriam os principais mediadores edematogênicos responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do óleo de cróton (MURAKAWA et al., 2006; SARAIVA et al., 2011).

A ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) pela PKC, promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o fator de transcrição nuclear- Kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), os quais têm um papel central na regulação da produção de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, óxido nítrico sintetase induzida (iNOS)) e moléculas de adesão (PASCUAL; GLASS, 2006). O aumento dos níveis teciduais dos metabólitos do AA, principalmente a PGE₂ e o LTB₄ parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após aplicação do óleo de cróton (MURAKAWA et al, 2006). Também nesse sentido, Nakamura et al. (2003) sugerem que os metabólitos do AA, produzidos via 5-LOX, são moléculas fundamentais para a formação do edema e infiltração leucocitária nesse modelo. Considerando que a PGE₂ contribui no aumento do fluxo sanguíneo através de sua ação vasodilatadora, enquanto os produtos via LOX (LTs), são necessários para o extravasamento plasmático e consequente formação do edema e infiltração leucocitária (YOUNG et al., 1984).

Em nossos estudos, o tratamento dos animais com o creme, no qual foi incorporado o EEB da planta em diferentes concentrações foi tão efetivo em reduzir o edema quanto a dexametasona, sugerindo que os fitoconstituintes presentes no extrato da planta possam estar inibindo a formação de mediadores do processo inflamatório, estimuladas pela via da PKC ou vias adjacentes envolvidas na inflamação. Sabe-se que os monoterpenos têm apresentado atividade anti-inflamatória relevantes, e podem ser eles os responsáveis pelos efeitos observados.

O AA quando aplicado topicamente produz um aumento imediato da permeabilidade vascular, resultado em um edema menor, de rápida instalação, o qual é associado com um marcante aumento dos níveis de prostaglandinas (PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$), TXA_2 , LTB_4 com menor incremento dos níveis de LTC_4 e LTD_4 , quando se compara ao edema induzido pelo TPA (NONATO et al, 2011). Pode-se sugerir que, o modelo “*in vivo*” de edema de orelha induzido por AA, apesar de não ser específico, é sensível, portanto apropriado, para testar inibidores da lipoxigenase. A aplicação tópica de AA resulta em formação rápida de edema, provavelmente devido à síntese de LTC_4 (GRISWOLD, 1991) e LTB_4 (GARRIDO, 2004).

No presente estudo, avaliou-se também o efeito anti-inflamatório tópico do EEB utilizando a CAP como indutora da inflamação. A CAP, quando aplicada topicamente produz uma resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por vasodilatação arteriolar, aumento de fluxo sanguíneo e consequente formação de edema por extravasamento plasmático, além de sensibilização à dor (KALIL-GASPAR, 2003). Esse efeito provém da estimulação de neurônios sensoriais de pequeno diâmetro e da liberação de mediadores neurogênicos da inflamação como a His, 5-HT e de neuropeptídeos, seguido da formação de edema cujo pico máximo é atingido até 30 minutos após a sua aplicação tópica (ZEGARSKA; LELINSKA; TYRAKOWSKI, 2006).

A CAP é quimicamente denominada como 8-metil-N-vanilil- 1-6-nonamida, e trata-se de um alcaloide encontrado na espécie *Capsicum annuum* L, esse alcaloide ativa receptores conhecidos como vanilóides, os quais são de potencial transitório, destacando-se principalmente o receptor tipo 1 (TRPV1). O TRPV1 é um receptor ionóforo não seletivo que pode ser ativado por vários agentes, como o calor, alguns prótons (pH abaixo de 5,9) e diferentes estímulos dolorosos como por exemplo o calor e o frio excessivo. Embora o receptor seja expresso exclusivamente em fibras

nociceptivas, o que aumenta sua importância no que se refere a dor, o TRPV1 é também modulado por inúmeros mediadores inflamatórios, incluindo fatores de crescimento, neurotransmissores, peptídeos, pequenas proteínas, lipídeos, cininas e citocinas (MA; QUIRION, 2007).

Esses receptores são encontrados nos neurônios nociceptivos e sua ativação ocasiona a liberação de neuropeptídeos como SP, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e neurocinina A. Além disso, pode mediar a liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), NO e outros mediadores inflamatórios (His e 5-HT) para a periferia, aumentando a permeabilidade vascular do tecido inflamado, além de transmitir informação de dor para o corno dorsal da medula espinhal (SANTOS; CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 2003). Foi verificado recentemente que agentes analgésicos (capsazepina e iodo-resiniferatoxina) inibem o processo de fosforilação desses receptores (ZEGARSKA; LELINSKA; TYRAKOWSKI, 2006; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009). Também já foi demonstrado que o receptor TRPV1 é ativado pela BK de forma independente, observada como os receptores de BK, a qual ocorre através dos sistemas de sinalização das proteínas PKC e PKA (BANDELL et al., 2004; WANG et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que a aplicação tópica do EEB obtido das folhas e caules de *C. ambrosioides*, também produziu redução do edema de orelha induzido tanto pelo AA, quanto pela CAP. Os resultados nos permitem sugerir que o EEB possa estar produzindo seu efeito antiedematogênico inibindo a síntese de eicosanóides e citocinas, onde a PGE₂ e o TNF- α seriam os principais mediadores (SARAIVA et al, 2011), além de interferir no desenvolvimento da resposta inflamatória mediada pela CAP. Neste sentido, os resultados observados com o creme feito com o EEB, foram os primeiros que validaram seu uso popular em processos inflamatórios cutâneos.

Outro modelo utilizado para estudar a atividade antiedematogênica da planta em estudo, foi o modelo do edema de pata induzido por agentes flogísticos como Cg, BK, SP e PGE₂. Nesses experimentos o EEB foi administrado nos animais por via oral, uma vez que na medicina popular, a planta também é usada por essa via. A avaliação do efeito antiedematogênico do EEB foi feita primeiramente, com a Cg como indutora do edema, de modo similar ao realizado por Ibironke e Ajiboye em 2007.

A Cg extraída da alga *Chondrus crispus* é um polissacarídeo sulfatado que pode ser separado em dois compostos. Uma fração transforma-se em gel sob a ação do íon potássio e é designada como K, e a outra que é insensível ao potássio foi chamada de lambda (λ). As frações K e λ representam respectivamente 40% e 60% do extrato não fracionado (Di ROSA, 1972).

O modelo de edema de pata induzido por Cg é um teste amplamente utilizado nos estudos de inflamação, para avaliar o envolvimento dos mediadores nas alterações vasculares associados com a inflamação aguda. Padronizado por Winter e colaboradores (1962), é amplamente utilizado até os dias de hoje. O desenvolvimento do edema, na pata dos animais, após a injeção de Cg tem sido descrito como um evento trifásico, em que vários mediadores operam em sequência para produzir resposta inflamatória. A fase inicial (0-1 h) da inflamação induzida pela Cg é mediada pela degranulação de mastócitos e pela liberação de His, serotonina, substância P e bradicinina. A segunda fase (1-6 h) está relacionada à elevada produção de prostaglandinas, pela ativação da COX-2 e radicais livres derivados de oxigênio. A terceira fase é sustentada pela liberação de PGs por macrófagos liberados e mediada por BK, LT, células polimorfonucleares (SILVA et al., 2005).

No presente estudo o EEB da planta foi capaz de reduzir o edema induzido por Cg, na fase inicial e final da resposta inflamatória. O extrato pode estar inibindo a liberação de alguns mediadores como: His, 5-HT, SP, BK e PGs. Como reportado anteriormente, estudos feitos por Ibironke e Ajiboye (2007), com o extrato metanólico das folhas de *C.ambrosioides* também demonstraram inibição da resposta antiedematogênica em diferentes fases induzida por Cg, corroborando com os dados obtidos (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007).

Uma vez que no modelo da inflamação induzida por Cg existe fases distintas, conforme o curso do processo inflamatório, havendo a participação de vários mediadores pró-inflamatórios, procurou-se investigar de forma mais direta, um possível mecanismo de ação do EEB da planta, utilizando alguns dos mediadores liberados durante o processo de inflamação induzido pela Cg, desta vez como indutores do edema. Verificamos primeiramente o efeito do EEB sobre o edema induzido pela SP.

A SP é um peptídeo que juntamente com a Neurocinina A, Neuropeptídeo K, Neuropeptídeo γ e Neurocinina B, pertencentes à família das taquicininas (O'CONNOR et al., 2004), ou seja, é um neurotransmissor, encontrado no cérebro e

medula espinhal, que está envolvido na regulação do limiar da dor e também associada a processos inflamatórios (SMITH et al., 2010). A SP é secretada por nervos e células inflamatórias tais como macrófagos, eosinófilos, linfócitos e células dendríticas, atuando em vários receptores farmacológicos, especialmente o receptor NK1 (HILL; OLIVER, 2007). Embora, o maior foco de estudo com as neurocininas sejam os processos dolorosos e inflamatório é incontestável o número de trabalhos e revisões encontradas na literatura, comprovando a ligação destes neuropeptídeos com outros processos biológicos, principalmente as desordens afetivas (GUIARD; LANFUMEY; GARDIER, 2006; CZECH; FUCHS; SIMON, 2006).

A SP está frequentemente presente num mesmo neurônio o CGRP, e a liberação de SP pode provocar a co-liberação de CGRP. A SP é um dos mais potentes vasodilatadores conhecidos, sendo 100 vezes superior à histamina. Pode, ainda, ser sintetizada em células do sistema imune, como monócitos, mastócitos e eosinófilos. A presença de SP na pele parece fortemente controlada pela disponibilidade do NGF, sintetizado pelas células epidérmicas, especialmente por queratinócitos (KALIL-GASPAR, 2003).

No processo inflamatório a SP induz a liberação de mediadores como: citocinas, radicais de oxigênio, derivados do AA e His, os quais potencializam a lesão tecidual e estimulam o recrutamento de leucócitos, amplificando a resposta inflamatória (HOLZER; HOLZER-PETSCHKE, 1997; BHATIA, 2010). Foi demonstrando por Calixto e Campos (2000), que a SP juntamente com a neurocinina A, está envolvida nos eventos do processo inflamatório, como a formação do edema, o extravasamento de proteínas plasmáticas, e a vasodilatação. A SP contribui para sensibilizar os receptores nociceptivos diretamente na periferia ou na membrana pós-sináptica (SATAKE; KAWADA, 2006). No presente estudo foi observado que o EEB foi capaz de reduzir o edema induzido por SP, a partir dos primeiros 30 minutos em todas as doses, e esta ação foi mantida ao longo do tempo do experimento. Pode-se aferir então que o extrato possa estar bloqueando os eventos do processo inflamatório mediados pela SP. Entretanto, estudos mais apurados e específicos são necessários para determinar o mecanismo de ação específico do EEB.

Outro mediador inflamatório usado como indutor do edema foi a BK. BK e cininas relacionadas formam um grupo de potentes peptídeos, os quais são aceitos como mediadores dos processos dolorosos e inflamatórios (CABRINI, 2001), atuando através de receptores metabotrópicos do tipo B1 e B2. O receptor B2 pode

promover eventos nos quais estão incluídos, vasodilatação, dor, aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de eicosanóides, como a PGE₂ e NO (FERREIRA; CAMPOS; CALIXTO, 2000). Por outro lado, os receptores B1 quando ativados por metabólitos das cininas, promovem a sustentação do estímulo doloroso e inflamatório, via expressão do NF κ B e glicocorticóides endógenos (CABRINI et al., 2001; MATTOS et al., 2006).

Na lesão tecidual ou infecção, há acúmulo, aderência e ativação de neutrófilos e de mediadores no local de inflamação, potencializando a ação das cininas. Em muitos tecidos, a BK estimula a fosfolipase A₂, promovendo a liberação de AA, culminando na produção de PGs e LTs, os quais desempenham papel importante na dor e inflamação (SHIRASAKI; KANAIZUMI; HIMI, 2009).

No presente estudo os resultados obtidos, no modelo do edema de pata induzido por BK corroboram com a hipótese de que o EEB possa estar bloqueando os eventos do processo inflamatório nos quais a BK está envolvida, uma vez que, também se observa que o EEB reduziu o edema de pata induzido pela Cg no período de tempo em que ocorre a liberação da BK, e a manifestação de seus efeitos.

O EEB também reduziu o edema induzido pela Cg após 4h da indução, período este em que as PGs são liberadas. Passou-se então a investigar o efeito do EEB sobre edema induzido por PGE₂. Dentre as prostaglandinas liberadas em processos inflamatórios e/ou dolorosos, a PGE₂ se destaca por ser uma das principais prostaglandinas pró-nociceptivas liberadas periféricamente. A PGE₂ exerce suas ações através da interação com receptores de membrana específicos, que podem ser divididos em quatro subtipos: EP1, EP2, EP3 e EP4 (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001, CLAUDINO et al., 2006). Estes receptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G e ativam a adenilato ciclase ou a fosfolipase C (PLC) (ZEILHOFER, 2007). A PGE₂ participa da dor aguda, sensibilizando as terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C, através do seu receptor EP1 (RADY; CAMPBELL; FUJIMOTO, 2001) e é responsável pela indução da produção de vários quimioatraentes, como LTB₄ e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- α (HARRIS et al., 2002; KAUR et al., 2004).

No presente estudo, o EEB não só foi efetivo em inibir o edema induzido pela Cg na fase final do processo, quando os prostanóides são liberados, como também inibiu o próprio edema induzido por prostanóides (PGE₂), indicando que seu

mecanismo possa estar envolvido com a inibição dos eventos nos quais a PGE_2 possa estar mediando durante o processo inflamatório (KAUR et al., 2004).

Para aprofundar os estudos sobre a avaliação da propriedade anti-inflamatória, foi utilizado o modelo de pleurisia induzida por Cg. A pleurisia é uma metodologia que lesiona a cavidade pleural, promovendo uma reação semelhante a que ocorre em consequência a infecções, inflamação ou doença neoplásica neste local. Mediadores inflamatórios são liberados e podem ser difundidos para o tecido pleural e subpleural, resultando em ativação de células constitutivas, incluindo células mesoteliais. Como consequência, observa-se recrutamento de células inflamatórias (leucócitos) na cavidade pleural, causando aumento no número de células no local (KROEGEL; ANTONY, 1997; MA, 2010).

A pleurisia é considerado como um dos modelos mais completos para investigar efeitos das substâncias em mecanismos envolvidos na inflamação aguda, tanto em eventos celulares quanto vasculares do processo inflamatório, bem como, é um modelo requisitado no *screening* e no desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios (PEREIRA; MEDEIROS; FRODE, 2006).

A indução da pleurisia pode ser feito por diversos indutores da inflamação como a Cg, BK, PGE_2 , SP dentre outros (BUSNARDO et al., 2010). Após a injeção intrapleural de Cg, esta é absorvida na pleura causando danos no tecido das células pleurais, liberando enzimas vasoativas, gerando um aumento da permeabilidade vascular e o desenvolvimento de edema no tecido subpleural. O evento é seguido por diapedese de neutrófilos e monócitos para dentro do tecido subpleural. A subsequente fagocitose da Cg, pelos neutrófilos resulta em degranulação e liberação de enzimas lisossomais decorrentes do aumento da permeabilidade dos vasos. A síntese e a liberação de prostaglandinas vasoativas completam o desenvolvimento da exsudação pleural, que se desenvolve graças à ação de monócitos (DALMARCO; FRÖDE; MEDEIROS, 2002; PASSOS et al., 2007).

Neste modelo também se observa um aumento significativo da migração de leucócitos, como os neutrófilos após a administração do agente dentro da cavidade pleural dos animais (KOERBELE et al., 2011). Como anteriormente reportado a migração de leucócitos em resposta a um estímulo inflamatório, envolve a interação dessas células com as moléculas de adesão (SCHMID-SCHONBEIN, 2006).

No presente estudo pode-se observar que o EEB foi efetivo, reduzindo o processo inflamatório agudo, induzido pela Cg no modelo de pleurisia. O pré-

tratamento dos animais com todas as doses utilizadas, produziram inibição significativa da resposta inflamatória, no que tange a migração de leucócitos (neutrófilos e monócitos) para o sítio inflamatório. Sendo assim, pode-se sugerir que o EEB pode estar atuando, em uma ou várias das manifestações celulares induzidas pela Cg.

Aprofundando ainda mais o estudo do efeito do EEB sobre o processo inflamatório, avaliou-se a atividade de enzimas-chave ligadas a inflamação, bem como mediadores importantes, em animais com pleurisia induzida por Cg. Nesse contexto, os resultados também demonstraram que o EEB foi eficaz em reduzir a atividade da MPO e ADA.

A MPO é uma enzima derivada de leucócitos, neutrófilos e basófilos que catalisa a formação de algumas espécies reativas oxidantes (radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)). Além de integrante da resposta imune inata, evidências têm comprovado a contribuição destes oxidantes para o dano tecidual durante inflamação. A MPO também está envolvida na morte de vários microorganismos e células estranhas, incluindo bactérias, fungos, vírus, glóbulos vermelhos, e células malignas e não malignas. A atividade da enzima é frequentemente usada como um marcador indireto da ativação de neutrófilos no sítio do processo inflamatório (FRODE; MEDEIROS, 2001; ROMAN; WENDLAND; POLANCZYK, 2008). Neste modelo observa-se que o EEB promoveu diminuição dessa enzima, o que pode corroborar para o efeito inibitório do extrato, sobre o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e células mononucleares.

A ADA é uma enzima que participa do catabolismo das purinas, encontrada no citosol e membrana celular. É responsável por promover a desaminação hidrolítica da adenosina em miosina. Altos níveis desta enzima são encontrados no sistema linfóide (linfonodos, baço e timo), podendo ser encontrada em menor quantidade nos eritrócitos (SABOURY et al., 2003). Por possuir um importante papel biológico no metabolismo dos nucleotídeos púricos, a enzima é essencial para a proliferação e diferenciação de células linfóides, particularmente células T e maturação de monócitos, possuindo assim uma função importante no sistema imune em processos inflamatórios (ANTONIOLI et al., 2008). Nos resultados obtidos sobre o efeito do EEB sobre a atividade da ADA, apenas a dose de 500 mg/kg inibiu significativamente a atividade da enzima. Consequentemente a ADA pode contribuir para limitar a infiltração excessiva de leucócitos e subsequentemente o dano celular.

Ainda com relação ao papel da ADA na inflamação, a possibilidade de que esta enzima possa interagir com outras proteínas da superfície celular, cria uma nova perspectiva na procura de mecanismos imunoregulatórios do processo inflamatório (FRODE; MEDEIROS, 2001).

Como anteriormente ressaltado o NO, é outro importante mediador pró-inflamatório, envolvido na exsudação e migração de leucócitos no processo inflamatório (ABRAMSON, 2008). O NO está envolvido na morte ou inibição da proliferação de microrganismos, destruição de células tumorais por macrófagos ativados e na defesa inespecífica do hospedeiro (CARLOS et al., 2005). Os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que o EEB diminuiu significativamente os níveis de NO. Este efeito também sugere que o efeito anti-inflamatório da planta em estudo pode estar associado com a inibição de espécies reativas de oxigênio, incluindo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$).

Procurou-se também verificar se o EEB poderia inibir a liberação de TNF- α . O TNF- α mostra-se como uma citocina-chave no desenvolvimento da inflamação pleural, atuando no aumento da produção de quimiocinas pelas células endoteliais (CAILHIER et al., 2006). As citocinas como as TNF α e IL-1 β são agentes pró-inflamatórios que estimulam a quimiotaxia celular e induz a expressão de moléculas de adesão. Outro efeito destas substâncias é a liberação de mediadores pró-inflamatória, tais como: a His, BK, SP e/ ou NO, no local do processo inflamatório. Por outro lado, a BK, a His e SP também podem liberar TNF- α e / ou IL-1 β a partir de células ativadas (BRENNAN; MCINNES, 2008). Em nossos experimentos a quantificação dos níveis de TNF- α no líquido pleural, demonstraram que o EEB foi capaz de suprimir a geração deste mediador, e os resultados podem sugerir que o EEB é capaz de agir sobre as células responsáveis pela secreção desta citocina, com consequente inibição da ativação e migração de neutrófilos. Agentes farmacológicos com potencial de inibição sobre o TNF- α são promissores na terapêutica da inflamação. Doenças como artrite reumatoide, Crohn e psoríase têm sido tratadas com fármacos como Etanercepte[®] e outros, os quais inibem os efeitos do TNF- α (FELDMANN, 2002; LOPES et al., 2011).

O segundo objetivo do presente estudo foi verificar se o EEB exibia efeito antinociceptivo, uma vez que a dor constitui um dos sinais cardinais do processo inflamatório. Além disso, na medicina popular, a planta em estudo é utilizada no

tratamento do processo doloroso. Como o EEB foi eficaz na inflamação induzida por mediadores como a BK e PGE_2 , os quais também participam do processo doloroso, procurou-se verificar se o processo doloroso induzido por tais mediadores poderiam ser inibidos pelo tratamento dos animais com o EEB. A antinocicepção induzida por EEB foi confirmada através de modelos de dor aguda, induzida por estímulos químicos como formalina, PGE_2 , CAP e BK.

Em 1977 Dubuisson e Dennis, padronizaram o modelo de dor induzida por formalina. O teste consiste na injeção intraplantar de formaldeído diluído (a formalina), o qual promove a estimulação de nociceptores, induzindo o animal a comportamentos típicos como lambear, e/ou morder a pata injetada com esse agente. Este modelo permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção. A primeira de origem neurogênica visualizada imediatamente após a injeção de formalina, durando aproximadamente 5 minutos. Hunskaar; Fasmer; Hole (1985), descreveram que nesta fase ocorre estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C, devido a mediadores como SP, glutamato e BK. A segunda fase é de origem inflamatória, tem início aproximadamente 15 minutos após a injeção da formalina e estende-se por até 30 minutos. Nesta fase ocorre a produção de múltiplos eventos, que incluem, inflamação nos tecidos periféricos mediada pela liberação de mediadores inflamatórios (PGs, NO, His e BK) e mecanismos de sensibilização espinhal e central (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001; GONÇALVES et al., 2008; SULAIMAN et al., 2010).

Ainda em relação à nocicepção induzida por formalina, foi demonstrado que a PGE_2 é liberada nos primeiros minutos após a injeção intraplantar de formalina em camundongos, e esse fato demonstra que este prostanoide além de sensibilizar neurônios, participando do estabelecimento da dor aguda, também promove a liberação de diversos aminoácidos excitatórios como glutamato, taurina e NO, os quais estão envolvidos com a transmissão da nocicepção periférica intensificando o processo (MALMBERG; YAKSH, 1995; MATTOS et al., 2006).

O tratamento dos animais com o EEB foi capaz de reduzir, de forma dose dependente a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória, além de inibir o edema induzido pela formalina. A inibição da resposta nociceptiva nas duas fases supõe que o EEB possui efeito antinociceptivo e anti-inflamatório, atuando na dor, tanto de origem neurogênica, como inflamatória. Estudos feitos anteriormente com o extrato

metanólico das folhas de *C.ambrosioides* também demonstraram inibição da resposta nociceptiva induzida pela formalina, confirmando os resultados obtidos neste estudo (IBIRONKE; AJIBOYE, 2007).

Cabe lembrar que no presente estudo, foi utilizada como controle positivo a indometacina, sendo este fármaco efetivo apenas na segunda fase do modelo da formalina, por ser um AINE não específico para COX, atuando na dor de origem inflamatória (crônica), e não na dor de origem neurogênica (aguda).

No modelo de nocicepção induzida por capsaicina, procurou-se analisar a possível ação modulatória do EEB, sobre a dor de origem neurogênica já detectada no modelo da formalina em sua primeira fase. O teste tem como objetivo, evidenciar a interação dos extratos em estudo sobre os neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa (SP, neurocinina A, neurocina B e CGRP). Também é referido que a dor induzida por capsaicina se assemelha muito com a primeira fase do modelo de formalina, caracterizando ambas as dores como uma dor do tipo neurogênica (OTUKI et al., 2001). Os resultados obtidos neste estudo, mostraram que o EEB reduziu de forma significativa a nocicepção causada pela injeção intraplantar de CAP, principalmente a dose de 500 mg/Kg, sugerindo assim uma possível ação na dor de origem neurogênica deste extrato testado.

No modelo de nocicepção induzida por BK observou-se que somente a dose de 500 mg/kg causou inibição, sugerindo uma possível interferência na via de sinalização do receptor B1. Estudos demonstram que o receptor B1 é crucial para o desenvolvimento e manutenção da dor inflamatória e neuropática em camundongos (MATTOS et al., 2006). A BK, a PGE₂ e as IL, contudo, parece exercer papel fundamental na nocicepção periférica. A PGE₂ e a BK causam alterações em receptores específicos (TRPV1) acoplados a canais iônicos ligante-dependente via ativação do AMPc, e das PKA e PKC, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa (ROCHA et al., 2007).

Nos experimentos realizados nesse estudo foram utilizados como fármacos de referência a indometacina e a dexametasona (controle positivo), por serem medicamentos efetivos em afecções inflamatórias e dolorosas. A indometacina é um anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido indolacético. É um inibidor não seletivo da enzima COX, diminuindo a formação de precursores de PGs e TX a partir do ácido araquidônico. O fármaco também reduz a migração dos neutrófilos e a proliferação de células do tipo T e B (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). A

ação terapêutica reside na inibição da COX-2, embora o fármaco iniba também a COX-1, resultando nos efeitos adversos desse fármaco e de outros da classe os quais não são seletivos. Um dos principais efeitos adversos oriundo da sua não seletividade sobre a COXs é a ulceração gástrica, resultante da inibição da síntese de PGs responsáveis pela muco-proteção do estômago (MONTEIRO et al., 2008). O efeito da indometacina é tão intenso e rápido, que ela é usada como modelo de indução de úlcera (SILVERIO et al., 2008).

A dexametasona, por sua vez, pertence à classe dos corticosteroides e exerce seus efeitos inibindo a produção de PGs e a migração de LT a nível nuclear. Esse efeito também é mediado pela síntese de proteínas, visto que os corticosteroides induzem a síntese de transcortina e macrocortina – proteínas que inibem a síntese de PGs através da inibição da PLA₂. As respostas mediadas por células podem ser inibidas indiretamente pela inibição da produção de determinadas citocinas, incluindo o TNF e as ILs (ANTI; GIORGI; CHAHADE, 2008). Na realidade, os genes responsáveis pela transcrição desses mediadores são suprimidos pelos glicocorticoides (LONGUI, 2007).

Outro objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do EEB sobre o processo de cicatrização. Já foi citado anteriormente que a planta em estudo é usada popularmente para a cicatrização de lesões. Para tanto se buscou um método que fosse prático, de baixo custo, reprodutivo e confiável (MARTINS et al., 2006). O modelo utilizado foi baseado em Cross et al., (1996), Lima et al., (2009), Malheiros et al., (2011). O modelo consiste na indução da lesão na região dorsal dos animais, por ser este um local de difícil manipulação pelos mesmos.

Como reportado anteriormente durante a evolução do processo de cicatrização, sabe-se que quando há uma ruptura do tecido epitelial e conjuntivo, microrganismos ali se instalam e desenvolvem-se com maior facilidade e velocidade. Em resposta a este trauma o organismo dá início a um processo inflamatório caracterizado pelo aumento de fluxo sanguíneo, formação de plaquetas, aumento de permeabilidade capilar e migração de leucócitos para a região lesada. A permeabilidade capilar promove extravasamento de plasma e seus componentes formam o exsudato inflamatório. Os neutrófilos, macrófagos e fibroblastos são as primeiras células inflamatórias a migrarem para a região lesada. São produtoras de substâncias quimiotáticas, com papel destacado para os eicosanoides (leucotrienos, TX e PGs) e quimiocinas (IL-1 e TNF- α) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Em nossos experimentos, sinais de infecção não foram observados no grupo tratado com a pomada de *C. ambrosioides*, o que pode ser explicado pela ação antimicrobiana e anti-inflamatória, confirmada nesse e em estudos prévios com a planta (DELESPAUL et al., 2000; IBIRONKE et al., 2007), desta forma, tanto a inibição do processo infeccioso quanto do evento inflamatório, propiciou ao tecido lesado uma reparação mais rápida, pois a lesão foi rapidamente preenchida por uma crosta que a isolou do meio ambiente mais rapidamente (FALEIRO et al., 2009).

No processo de cicatrização a contração da lesão é mediada por citocinas e em particular pelo fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Através da contração, o tamanho da lesão diminui substancialmente, sendo esta diminuição causada pelos fibroblastos e produção de colágeno, responsáveis pela formação do tecido de granulação e por fim ocorre à substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, 2007). Achados histológicos e clínicos consideram a formação de crosta como um sinal positivo no reparo, apresentando uma maior formação de vasos sanguíneos e fibras colágenas (RIBEIRO et al., 2004). Em situações especiais, mediadores inflamatórios permanecem na lesão dificultando sua cicatrização. Em nosso experimento a crosta foi mais evidente no grupo tratado com o EEB do que no grupo controle. Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento dos animais com a pomada de EEB a 5%, produziu fechamento da lesão de forma mais rápida quando comparado com o grupo controle, comprovando que o uso do extrato incorporado na pomada contribui na reparação de lesões. Pode-se sugerir também que ação anti-inflamatória (neste estudo constatado) e antimicrobiana (como descrita pela população) do extrato tenha contribuído com o processo de cicatrização.

Também foram realizados no presente estudo, modelos farmacológicos adicionais buscando evidenciar possíveis efeitos adversos e/ou tóxicos do EEB, que pudessem interferir nos resultados observados, ou inviabilizasse o uso da planta como terapia alternativa. Foram selecionados dois modelos farmacológicos geralmente requisitados em estudos de screening de substâncias antinociceptivas e anti-inflamatórias: o modelo de rota-rod e modelo de hipotermia. O modelo de Rota-rod foi padronizado por Dunham e Miya em 1957, cujo objetivo é excluir a possibilidade de a substância testada estar ocasionando alterações motoras não desejáveis, via inibição inespecífica do SNC (SULAIMAN et al., 2010). No presente estudo observou-se que o tratamento dos animais com EEB em todas as doses

utilizadas, não induziu qualquer interferência no desempenho motor dos animais avaliados através do modelo de rota rod.

Fármacos analgésicos podem atuar centralmente promovendo hipotermia. Quando se estuda o efeito antinociceptivo de substâncias, também é verificado se a mesma possa provocar tal efeito (ALFONSI et al., 2004), sendo assim, o objetivo desse experimento é excluir uma possível interferência da substância testada na temperatura corporal do animal (hipotermia ou hipertermia)

No presente estudo não foram evidenciados aumento ou diminuição da temperatura corporal dos animais tratados com o EEB, sendo este resultado já esperado, uma vez que, o trabalho realizado por Hallal e colaboradores (2010), foi demonstrado que o extrato aquoso da planta exibe propriedade antipirética (HALLAL et al 2010).

A literatura sobre a *C. ambrosioides* e o uso popular indicam que a mesma exibe efeitos toxicológicos com doses elevadas e com uso prolongado. Entretanto, os relatos da literatura são contraditórios. Pereira e colaboradores (2010), realizaram um estudo toxicológico com tratamento subcrônico, usando o extrato hidroalcoólico da planta em camundongos. Os autores concluíram que o tratamento induziu alterações pontuais nos grupos tratados com doses mais altas (700 a 1000 mg/kg). No entanto, o tratamento não foi letal, e não induziu alterações tóxicas quando foram utilizadas doses terapêuticas, baseadas no uso popular, sugerindo segurança do produto em doses adequadas (PEREIRA et al., 2010). A toxicidade dessa planta é atribuída aos constituintes do óleo essencial (MONZOTE et al., 2009, 2011). O uso do óleo essencial dessa espécie como anti-helmíntico para humanos foi substituído por medicamentos mais modernos e seguros (PAGET, 1926). O óleo contém ascaridol, o qual tem sido responsável por fatalidades em humanos (MACDONALD et al., 2004). De acordo com Salant e Mitchell (1916), quando injetado na corrente sanguínea o óleo provoca uma depressão da circulação, respiração e movimentos intestinais. Entretanto, apesar do exposto, essa espécie de *Chenopodium* ainda continua a ser usada no tratamento de vermes do intestino e outras doenças em humanos, com aparente sucesso não só no Brasil como em outros países (QUINLAN; QUINLAN; NOLAN, et al., 2002; MORAIS et al., 2005), não sendo encontrado na literatura científica relatos de casos de severos envenenamentos ou mortes, a partir da infusão aquosa de *C. ambrosioides* (KLIKIS, 1985).

Com base nesses dados sobre a toxicologia da planta, em nossos experimentos, as doses utilizadas por via oral, foram menores do que utilizadas nos ensaios toxicológicos conduzidos por Pereira e colaboradores (2010). Além disso, durante a execução dos mesmos, não foram observadas alterações comportamentais e fisiológicas que pudessem evidenciar sinais de intoxicação.

Com objetivo de descartar a possibilidade de efeitos tóxicos, um único experimento foi realizado, investigando a toxicidade do EEB, o teste do MTT. O teste de citotoxicidade celular pode ser utilizado como uma estratégia para avaliar a viabilidade celular, em diferentes concentrações dos agentes não tumorais *in vitro* (KUMALA et al, 2003).

A atividade citotóxica da célula L929 não tumoral, exposta por 48h ao EEB de *C. ambrosioides* foi determinada por quantificação através da redução do MTT a formazan ocasionada indiretamente pela ação das enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007).

O ensaio de viabilidade celular do EEB não alterou a viabilidade das células em cultura em todas as concentrações testadas, quando comparado ao controle. Vale ressaltar que ausência de atividade citotóxica aqui demonstrada não corrobora com os estudos da literatura, os quais reportam atividades citotóxicas (RUFRA et al., 2002; PEREIRA et al., 2010).

Os estudos fitoquímicos da planta revelaram a presença de diversos constituintes. Dos terpenos encontrados na planta se destaca o ascaridol, isoascaridol, cis-p-menta-1(7),8-dien-2-ol, (CAVALLI et al., 2004; AHMED, 2000), α -terpeniol, α -terpineno, p-cinemo e carvacrol. Há estudos que relatam que a planta apresenta flavonoides, e também outros constituintes fitoquímicos como o alcaloide que poderiam contribuir para a atividade anti-inflamatória e analgésica (HEGAZY; FARRAG, 2007).

O estudo fitoquímico aqui realizado detectou a presença de ascaridol e 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano no EEB, confirmando os resultados previamente reportados (AHMED, 2000; CAVALLI et al., 2004).

Dembistk e colaboradores (2008), detectaram vários terpenos na planta, sendo o mais abundante o ascaridol. Ibironke e Ajiboye (2007), mostraram em seu estudo que a planta apresenta efeitos farmacológicos (anti-inflamatório e analgésico) e relatou também a presença de terpenos. De fato, já foi descrito na literatura que os terpenos α -humaleno, β -cariofelino e ácido caurenóico encontrados na planta

(PASSOS et al., 2007; TAPPIN et al., 2004), exibem efeitos sobre a dor e a inflamação.

Além dos terpenos, alcaloides a planta em estudo possui os flavonoides. Aos flavonoides são atribuídas diversas propriedades anti-inflamatória e analgésica (KIM et al., 2004). A quercetina é o flavonoide mais estudado que existe, tendo efeitos periféricos e centrais importantes, sendo atualmente usado em países europeus como complemento alimentar (BEHLING et al., 2004). Embora, tenha sido citado a presença deste flavonoide na espécie estudada, em nossas análises ele não foi detectado. Talvez, em nossas amostras a quantidade de quercetina era tão pequena que talvez não tenha sido detectada. Entretanto, vários são os trabalho científicos enfatizando seus efeitos analgésicos e anti-inflamatórios (PARVEEN et al., 2007; ROSA et al., 2010; HERNANDES et al., 2010).

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo corroboram e ampliam os estudos prévios sobre o efeito anti-inflamatório, cicatrizante e antinociceptivo de *C. ambrosioides*, apontando como mecanismo de ação dessas propriedades a inibição de mediadores-chave envolvidos no processo doloroso e inflamatório, principalmente. Além disso, os resultados apontam que o EEB utilizado topicamente torna-se uma alternativa terapêutica para o tratamento de processos inflamatórios e cicatrizantes acompanhado de dor. Entretanto, mesmo que o ensaio toxicológico preliminar tenha sido negativo, uma avaliação toxicológica mais abrangente poderá ser necessária para a completa validação da planta em estudo.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram, que o estudo fitoquímico com o extrato etanólico das folhas e caules de *C. ambrosioides*, resultou na obtenção dos compostos ascaridol e 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano, caracterizando fitoquimicamente a espécie.

O EEB de *C. ambrosioides* apresenta atividade anti-inflamatória, quando administrado topicamente e oralmente nos modelos de edema de orelha e pata. Este efeito também é percebido pela inibição da migração de neutrófilos e monócitos no experimento de pleurisia, e inibição de enzimas relacionadas à atividade celular (MPO e ADA), inibição dos níveis de nitrito/nitrato e da produção de TNF- α .

O EEB de *C. ambrosioides* apresentou ação antinociceptiva nos modelos agudos utilizados.

No experimento de cicatrização cutânea observou-se que a pomada com extrato concentrado a 5%, apresentou eficácia significativa em relação ao controle negativo.

Observou-se que o extrato não provocou alterações motoras nos animais conforme visto através do modelo de rota rod, nem hipotermia nos mesmos.

O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o EEB, nas concentrações usadas, não apresentou efeito citotóxico frente à célula L929.

Pode-se sugerir com base nos estudos fitoquímicos da planta e estudos farmacológicos anteriores, que a efetividade do EEB de *C. ambrosioides* sobre os processos inflamatórios, dolorosos e cicatrizantes, provavelmente é devido aos seus fitoconstituintes, dentre eles os terpenos.

Os resultados em conjunto validam parcialmente a planta em estudos para uso terapêutico em processos inflamatórios, dolorosos e cicatrizantes.

REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, S.B. Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. **Arthritis Research Therapy**, v.10, n.2, p.1-7, 2008.
- AHMED, A.A. Highly Oxygenated Monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.989-991, 2000.
- ALFONSI, P.; ADAM, F.; PASSARD, A.; GUIGNARD, B.; SESSLER, D.I.; CHAUVIN, M. Nefopam, a Non-sedative Benzoxazocine Analgesic, Selectively Reduces the Shivering Threshold. **Anesthesiology**, v.100, n.1, p.37-43, 2004.
- AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of *compositae* and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n.6, p.1255-1260, 1996.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent Pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, p.40-56, 2004.
- ALWANI, M.E.; WU, B.X.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.171-183, 2006.
- AMENDOEIRA, F.C.; FRUTUOSO, V.S.; ZANON, C.; CHEDIER, L.M.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.; BANDEIRA-MELO, C.; BOZZA, P.T.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C. Anti-inflammatory activity in the aqueous crude extract of the leaves of *Nidularium procerum*: A bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.6, p.1010-1015, 2005.
- ANDÚJAR, I.; RECIO, M.C.; BACELLI, T.; GINER, R.M.; RÍOS, J.L. Shikonin reduces oedema induced by phorbol ester by interfering with I κ B α degradation thus inhibiting translocation of NF- κ B to the nucleus. **British Journal of Pharmacology**, v.160, p.376-388, 2010.
- ANSONOFF, M.A.; ZHANG, J.; CZYZYK, T.; ROTHMAN, R.B.; STEWART, J.; XU, H.; ZJWIONY, J.; SIEBERT, D.J.; YANG, F.; ROTH, B. L.; PINTAR, J.E. Antinociceptive and Hypothermic Effects of Salvinatorin A Are Abolished in a Novel Strain of μ -Opioid Receptor-1 Knockout Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.641-648, 2006.
- ANTI, S.M.A.; GIORGI, R.D.N.; CHAHADE, W.H. Glicocorticóides (GC) e as doenças reumáticas do idoso: considerações gerais. **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, n.3, 2008.
- ANTONIOLI, L.; FORNAI, M.; COLUCCI, R.; GHISU, N.; TUCCORI, M. DEL TACCA, M.; BLANDIZZI, C. Pharmacological modulation of adenosine system: Novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, n.4, p.566-574, 2008.
- ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v.2005, n.4, p.228-232, 2005.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.41, n.1, p.27-51, 2005.

BANDEIRA-MELO, C.; SERRA, M.F.; DIAZ, B.L.; CORDEIRO, R.S.; SILVA, P.M.; LENZI, H.L.; BAKHLE, Y.S.; SERHAN, C.N.; MARTINS, M.A. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *Journal of Immunology*, v.164, n.2, p.1029-1036, 2000.

BANDELL, M.; STORY, G.M.; HWANG, S.W.; VISWANATH, V.; EID, S.R.; PETRUS, M.J.; EARLEY, T.J.; PATAPOUTIAN, A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, v.41, p.849-857, 2004.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, v.32, n.3, p.679-688, 2009.

BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, v.139, p.267-284, 2009.

BASILE, A.C.; SERTIÉ, J.A.A.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T.T.; AZZOLINI, C.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. *Journal of Ethnopharmacol*, v.30, p.185-197, 1990.

BAWOLAK, M.T.; FORTIN, J.P.; VOGEL, L.K.; ADAM, A.; MARCEAU, F. The bradykinin B₂ receptor antagonist icatibant (Hoe 140) blocks aminopeptidase N at micromolar concentrations: Off-target alterations of signaling mediated by the bradykinin B₁ and angiotensin receptors. *European Journal of Pharmacology*, v.551, p.108-111, 2006.

BELCH, J.J.F.; HILL, A. Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.71, p.352s, 2000.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais E Ações Biológicas, *Alimentos e Nutrição*, v.15, n.3, p.285-292, 2004.

BELMONTE, C.; VIANA, F. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular Pain*, v.4, p.14, 2008

BEZERRA-SANTOS, C.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BANDEIRA-MELO, C.; PIUVEZAM, M.R.; BOZZA, P.T. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *International Immunopharmacol*, v.6, n.7, p.1152-1160, 2006.

BHATIA, M. Hydrogen sulfide and substance P in inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.12, n.10, p.1191-1202, 2010.

BIONDO, R.; PEREIRA, A. M.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANCA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. *Biochimie.*, v.85, p.1017-1025, 2003.

BORGES, M.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ANDRAIO-ESCARSO, S.H.; DINIZ, H.; HAMAGUCHI, A.; QUINTERO, A.; LIZANO, S.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R.;

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.127, n.1, p.21-30, 2000.

BRANCO NETO, M.L.C.; RIBAS FILHO, J.M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M.A.; CZECZKO, N.G. AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V.R.; TEIXEIRA, H.M.; AGUIAR, L.R.F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, Suppl.2, v.21, p.15-20, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Portaria Interministerial nº 2960 em 9 de dezembro de 2008. Publica o Programa de Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 10 de dez. 2008a.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n.1. p.229-239, 2010.

BRENNAN, F.M.; MCINNIS, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.3537–3545, 2008.

BRENNAN, F.B.; CARR, D.B.; COUSINS, M. Pain Management: A Fundamental Human Right. **Pain Medicine**, v.105, p.205-221, 2007. Review.

BRISTOW, L.J.; FLATMAN, K.L.; HUTSON, P.H.; KULAGOWSKI, J.J.; LEESON, P.D.; YOUNG, L.; TRICKLEBANK, M.D. The atypical neuroleptic profile of the glycine/N-methyl-D aspartate receptor antagonist, L-701,324, in rodents. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 277, n.2, p.578-585, 1996.

BROUGHTON, G.; JANIS, J.E.; ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.117 (7 suppl.), p.12S-34S, 2006.

BUSNARDO, T.C.P. M.; PADOANI, C.; MORA, T.C.; BIAVATTI, M.W.; FRODE, T.S.; BURGER, C.; CLAUDINO, V.D.; DALMARCO, E.M.; SOUZA, M.M. Anti-inflammatory evaluation of *Coronopus didymus* in the pleurisy and paw oedema models in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.519-525, 2010.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v.107, n.2, p.139-154, 2005.

BUTLER, M.S. Natural products to drugs: Natural product – derived compounds in clinical trials. **Natural Product Reports**, n.25, p.475-516, 2008.

CABRINI, D.A.; CAMPOS, M.M.; TRATSK, K.S.; MERINO, V.F.; SILVA JR, J.A.; SOUZA, G.E.P.; AVELLAR, M.C.W.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. Molecular and pharmacological evidence for modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous glucocorticoids hormones in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.132, p.567-577, 2001.

CAILHIER, J.F.; SAWATZKY, D.A.; KIPARI, T.; HOULBERG, K.; WALBAUM, D.; WATSON, S.; LANG, R.A.; CLAY, S.; KLUTH, D.; SAVILL, J.; HUGUES, J. Resident pleural macrophages are key orchestrators of neutrophil recruitment in pleural inflammation.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v.173, n.5, p.540-547, 2006.

CALIXTO, L.B.; CAMPOS, M.M. Neurokinin mediation of edema and inflammation. **Neuropeptides**, v.34, n.5, p.314-322, 2000.

CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, R.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; CABRINI, D.A.; CAMPOS, M.M. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. **British Journal of Pharmacology**, v.143, n.7, p.803-818, 2004.

CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Involvement of B1 or B2 receptors in bradykinin induced rat paw oedema. **British Journal of Pharmacology**, v.114, p.1005-1013, 1995.

CAMPOS, A.C.L.; GROTH, A.K.; BRANCO, A.B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.11, p.281-288, 2008.

CAO, S.; PAN, S.; YAO, X.; FU H. Isolation and Purification of Anthocyanins from Blood Oranges by Column Chromatography. **Agricultural Sciences in China**, v.9, n.2, p.207-215, 2010.

CARLOS, I.Z.; LOPES, F.C.M.; BENZATTI, F.P.; CARLI, C.B.A.; MARQUES, M.F.; JORDÃO JUNIOR, C.M.; RINALDO, D.; CALVO, T.R.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. Ação do extrato metanólico e etanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Malpighiaceae) na resposta immune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.44-50, 2005.

CARRAWAY, M.S.; WELTY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.167, p.1200-1209, 2003.

CARVALHO, J.C.T. Calêndula (*Calendula officinalis* L.). In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.257-265, 2004.

CARVALHO, E.S. Picão (*Bidens pilosa* L.). In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.375-381, 2004.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, n.18, p.314-319, 2008.

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

CAVALLI, J.F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A.F.; CASANOVA, J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³CNMR spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, v.15, p.275-279, 2004.

CHEVALLIER, A. **The encyclopedia of medicinal plants**. New York: A D K Publishing Book, 1996.

CHIU, Y.; HUANG, T.; CHIU, C.; LU, T.; CHEN, Y.; PENG, W.; CHEN, C. Analgesic and Antiinflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both In Vitro and In Vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p.1-11, 2011.

CISNEROS, F.J.; JAYO, M.; NIEDZIELA, L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.355-364, 2005.

CLAUDINO, R.F.; KASSUYA, C.A.L.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J.B. Pharmacological and Molecular Characterization of the Mechanisms Involved in Prostaglandin E₂-Induced Mouse Paw Edema. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.318, n.2, p.611-618, 2006.

COELHO, J.M.; ANTONIOLLI, A.B.; SILVA, D.N.; CARVALHO, T.M.M.B.; PONTES, E.R.J.C.; ODASHIRO, A.N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro Cirurgiões**, v. 37, n. 1, 2010.

CORTRIGHT, D.N.; KRAUSE, J.E.; BROOM, D.C. TRP channels and pain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1772, p.978-988, 2007.

COSTA, L.C.B.; CORRÊA, R.M.; CARDOSO, J.C.W.; PINTO, J.E.B.P.; BERTOLUCCI, S.K.V.; FERRI, P.H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira, Brasília**, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

COSTA, M.V.L.; TAVARES, E.S. Anatomia folicular de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)- erva-de-santa-maria. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, n.3, p.63-71, 2006.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009. Disponível em: < <http://www.uff.br/RVQ> > Acesso em: 26 de Maio de 2010.

CRAIG, A. N. D. Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing. **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.1-30, 2003

CRIADO, P.R.; CRIADO, R.F.J.; MARUTA, C.W.; MACHADO FILHO, C.A. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p.195-210, 2010. Revisão.

CROSS, S.E.; THOMPSON, M.J.; ROBERTS, M.S. Distribution of systemically administered ampicillin, benzylpenicillin, and flucloxacillin in excisional wounds in diabetic and normal rats and effects of local topical vasodilator treatment. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, n.7, p.1703-1710, 1996.

CUNHA, F.M.; FRODE, T.S.; MENDES, G.L.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. **Life Sciences**, v.70, p.159-169, 2001.

CZECH, B.; FUCHS, E.; SIMON, M. NK1 receptor antagonists under investigation for the treatment of affective disorders. **Expert Opinion Investigational Drugs**, v.15, n.5, p.479-486, 2006.

DAI, Y.; YE, W.C.; WANG, Z.T.; MATSUDA, H.; KUBO, M.; BUT, P.P.H. Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.245-250, 2002.

DALMARCO, E.; FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v.11, p.299-306, 2002.

DELESPAUL, Q.; DE BILLERBECK, V. G.; ROQUES, C. G.; MICHEL, G. The antifungal activity of oils as determined by different screening methods. **Journal of Essential Oil Research**, v.12, n.2, p.256-266, 2000.

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I.; HANUS, L.O. ASCARIDOLE AND RELATED PEROXIDES FROM THE GENUS *CHENOPODIUM*. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v.152, n.2, p.209-215, 2008.

DEMBITSKY, V.M. Bioactive peroxides as potential therapeutic agents. Review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.223-251, 2008.

DENZLINGER, C.; RAPP, S.; HAGMANN, W.; KEPPLER, D. Leukotrienes as mediators in tissue trauma. **Science**, v.230, p.330-332, 1985.

DIAS, R.G.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, M.H. Óxido Nítrico e Sistema Cardiovascular: Ativação Celular, Reatividade Vascular e Variante Genética. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 96, n1, p.68-75, 2011. Artigo de Revisão

DI ROSA, M.; LALENTI, A.; IANARO, A.; SAUTENBIN, I. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathway. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, v.54, p.229-238, 1996.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

DI STASI, L.C.; SANTOS, E.M.G.; SANTOS, C.M. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1987.

DUBIN, A.E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. Review series. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.11, p.3760-3772, 2010.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, n. 1, p. 161-174, 1977.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v, 46, n.3, p.208-209, 1957.

DUSSE, L.M.S.A.; VIERA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

FALEIRO, C.C.; ELIAS, S.T.H.; CAVALCANTI, L.C.; CAVALCANTI, A.S.S. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.56- 60,2009.

FANK-DE-CARVALHO, S.M.; MARCHIORETTO, M.S.; BÃO, S.N. Anatomia foliar, morfologia e aspectos ecológicos das espécies da família Amaranthaceae da Reserva Particular do Patrimônio Natural Cara Preta, em Alto Paraíso, GO, Brasil. **Biota Neotropica**, v.10, n.4, p.77-86, 2010.

FELDMANN, M. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.5, p.364-371, 2002.

FERGUSON, L.R. Chronic inflammation and mutagenesis. Review. **Mutation Research**, v.690, p.3-11, 2010.

FERREIRA, P.K.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. The role of sensorial neuropeptides in the edematogenic responses mediated by B(1) agonist des-Arg (9) BK in rats pre-treated with LPS. **Regulatory Peptides**, v.89, p.29-35, 2000.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAÚJO, R.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, v.43, p.1188-1197, 2002.

FRANCA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.29, p.229-232, 1996.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, S.M. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.25, n.4, p.575-584, 2010.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**, v.10, p.223–227, 2001.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. **Methods in Molecular Biology**, v.225, p.129-137, 2003.

GARRIDO, M. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L extract (Vimang). **Pharmacological Research**, v.50, p.143-149, 2004.

GEOVANINI, T.; OLIVEIRA, A.G.JR.; PALERMO, T.C.S. **Manual de curativos**. São Paulo: Corpus, 2007.

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, n.5, p.401-16, 2004.

GOADSBY, P.J.; LIPTON, R.B.; FERRARI, M.D. Migraine: current understanding and treatment. **New England Journal of Medical**, v.336, p.257-270, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v.66, p.89-98, 2005.

GONÇAVES, J.C.R.; OLIVERIA, F.S.; BENEDITO, R.B.; SOUSA, D.P.; ALMEIDA, R.N.; ARAUJO, D.A.M. Antinociceptive activity of (-)-Carvone: Evidence of Association with Decreased Peripheral Nerve Excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n.5, p.1017-1020, 2008.

GONZÁLEZ-PÉRIZ, A.; CLÀRIA, J. New approaches to the modulation of the cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.7, p.1-13, 2007.

GOODMAN, L., TORRES, B., PUNKE, J., REYNOLDS, L., SPEAS, A., ELLIS, A., BUDSBERG, S. Effects of firocoxib and tepoxalin on healing in a canine gastric mucosal injury model. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.23, p.56-62, 2009.

GRIEVE, J. Sterilizable thermometers for measuring intra-abdominal temperature. **Lancet**, v.2, p.431-432, 1951.

GRIFFIS, C.A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research Nursing**, v.7, n.4, p.297-312, 2006.

GRISWOLD, D.E. Pharmacology of the pyrroloimidazole, SK eF 105809-II anti-inflammatory activity and inhibition of mediator production in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v.42, p.825-831, 1991.

GROTE, K.; SCHÜTT, H.; SCHIEFFER, B. Toll-Like Receptors in Angiogenesis. **TheScientificWorldJOURNAL**, v.11, p.981-991, 2011.

GUIARD, B.P.; LANFUMEY, L.; GARDIER, A.M. Microdialysis approach to study serotonin outflow in mice following selective serotonin reuptake inhibitors and substance P (neurokinin 1) receptor antagonist administration: a review. **Current Drug Targets**, v.7, n.2, p.187-201, 2006.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.; INADA, M.; BALBÍN, M.; FUEYO, PITIOT, A.S.; ASTUDILLO, A.; HIROSE, K.; HIRATA, M.; SHAPIRO, S.D.; NOEL, A.; WERB, Z.; KRANE, S.M.; LÓPEZ-OTÍN, C.; PUENTE, X.S. Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). **The FASEB Journal**, v.21, p.2580-2591, 2007.

HALLAL, A.; BENALI, S.; MARKOUK, M.; BEKKOUICHE, K.; LARHSINI, M.; CHAIT, A.; ROMANE, A.; ABBAD, A.; EL ABDOUNI, M.K. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **Asian Journal of Biological Sciences**, v.1, 189-192, 2010.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **The New England Journal Medicine**, v.352, n.16, p.1685-1695, 2005.

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R.P. Prostaglandins as Modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v.23, p.144-150, 2002.

HAWKEY, C.J. COX-1 and COX-2 inhibitors. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.15, n.5, p.801-820, 2001.

HEGAZY, A.K.; FARRAG, H.F. Allelopathic potencial of *Chenopodium ambrosioides* on germination and seedling growth of some cultivated and weed plants. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.2. n.1, p.01-09, 2007.

HERBERT, M.K.; JUST, H.; SCHMIDT, R.F. Histamine excites groups III and afferents from the cat knee joint depending on their resting activity. **Neuroscience Letter**, v.305, p.95-98, 2001.

HERNANDES, M.F.; FALÉ, P.V.L.; ARAÚJO, M.E.; SERRALHEIRO, M.L.M. Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several *Hypericum* species. **Food Chemistry**, v.120, p.1076-1082, 2010.

HILÁRIO, M.O.E., TERRERI, M.T., LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxygenase 2. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, 2006.

HILL, R.G.; OLIVER, K.R. Neuropeptide and kinin antagonists. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.177, p.181-216, 2007.

HMAMOUCI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI, A. Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, v.71, p.308-314, 2000.

HOFSETH, L.J. Nitric oxide as a target of complementary and alternative medicines to prevent and treat inflammation and cancer. **Cancer Letters**, v.268, n.1, p.10-30, 2008.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCH, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation. **Pharmacology Therapy**, v.73, p.219-263, 1997.

HORIUCHI, M.; SEYAMA, W. Antiinflammatory and antiallergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. **Journal of Health Science**, v.52, n.6, p.711-717, 2006.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.69-76, 1985.

HWANG, S.W.; CHO, H.; KWAK, J.; LEE, S.Y.; KANG, C.J.; JUNG, J.; CHO, S.; MIN, K.H.; SUH, Y.G.; KIM, D.; OH, U. Direct activation of capsaicin receptor by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the U.S.A.**, v.97, p.6155-6160, 2000.

IBIRONKE, G.F.; AJIBOYE, K.I. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. **International Journal of Pharmacology**, v.3, n.1, p.111-115, 2007.

JARDIM, C.M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Chemical Ecology**, v.34, p.1213-1218, 2008.

JENSEN, T.S.; BARON, R. Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. **Pain**, v. 102, p.1-8, 2003.

JORGE, S.A.; DANTAS, R.S.P.E. **Abordagem multidisciplinar no tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005.

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

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, n.4, p.483-498, 2003.

KAM, P.C.A.; SEE, A.U.L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. **Anaesthesia**, v.55, p.442-449, 2000.

KAUR, G.; HAMID, H.; ALI, A.; ALAM, M.S.; ATHAR, M. Antiinflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.285-292, 2004.

KELLY, M.; KWANG, J.M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunologic**, v.120, p.3-10, 2007.

KLIKS, M.M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evalution and clinical fields trials. **Social Science and Medicine**, v.21, p.879-886, 1985.

KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, p.229-245, 2004.

KINSINGTON, D.G. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal of Natural Products**, v.74, p.456-511, 2011.

KOEBERLE, A.; ROSSI, A.; BAUER, J.; DEHM, F.; VEROTTA, L.; NORTHOFF, H.; SAUTEBIN, L.; WERZ, O. Hyperforin, an anti-inflammatory constituent from St. John's wort, inhibits microsomal prostaglandin E₂ synthase-1 and suppresses prostaglandin E₂ formation *in vivo*. **Frontiers in Pharmacology**, v.2, p. 1-7, 2011.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z.; NEDIALKOV, P.T.; NIKOLOV, S.D. The genus *chenopodium*: Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology. **Pharmacognosy Review**, v.3, n.6, p. 280-306, 2009.

KOKANOVA-NEDIALKOVA, Z.; BUCHERL, D.; NIKOLOV, S.; HEILMANN, J.; NEDIALKOV, P.T. Flavonol glycosides from *Chenopodium foliosum* Asch. **Phytochemistry Letters**, v.257, p.1-5, 2011.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira Reumatologia**. [online]., v.46, p.199-206, 2006.

KROEGEL, C.; ANTONY, V.B. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. **European Respiratory Journal**, v.10, p.2411-2418, 1997.

KULJANABHAGAVAD, T.; THONGPHASUK, P.; CHAMULITRAT, W.; WINK, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. **Phytochemistry**, v.69, p.1919-1926, 2008.

KUMALA, S.; NIEMIEC, C.; WIDEL, R.; HANCOCK, E.; RZESZOWSKA-WOLNY, J. Apoptosis and clonogenic survival in three tumour cell lines exposed to gamma rays or chemical genotoxic agents. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v.8, n.3, p.655-665, 2003.

KUMPUN,S.; MARIA, A.; CROUZET, S.; EVRARD-TODESCHI,N.; GIRAULT, J.P.; LAFONT,R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., na ancient Andean crop of high nutritional value. **Food Chemistry**, v.125, p.1226-1234, 2011.

KVATERNICK, V., POLLMEIER, M., FISCHER, J., HANSON, P.D. Pharmacokinetics and metabolism of orally administered firocoxib, a novel second generation coxib, in horses. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.30, p.208-217, 2007.

LALL, N.; MEYER, J.J.M. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically select South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.347-354, 1999.

LANGFORD R M. Pain management today—what have we learned? **Clinical Rheumatology**, v.25, p.2-8, 2006.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal Pain**, v.10, n.9, p.895-926, 2009.

LEES, P., LANDONI, M.F., GIRAUD, J., TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics**, v.27, p.479-490, 2004.

LI, X.; ELLMAN, M.; MUDDASANI, P.; WANG, J.H.C.; CS-SZABO, G.; WIJNEN, A.J.V.; IM, H.J. Prostaglandin E₂ and Its Cognate EP Receptors Control Human Adult Articular Cartilage Homeostasis and Are Linked to the Pathophysiology of Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.60, n.2, p.513-523, 2009.

LI, M.; SHANG, Y.; WEI, B.; YANG, Y. The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro. **Journal of Inflammation**, v.8, n.18, p.1-9, 2011.

LIEW, F.Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunology Letters**, v.85, p. 131-134, 2003.

LIMA, R.R.; COSTA, A.M.R.; DE SOUZA, R.D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativa. **Revista Paranaense de Medicina**, v.21, n.2, p.29-33, 2007.

LIMA, C. C.; PEREIRA, A.P.C.; SILVA, J.R.F.; OLIVEIRA, L.S.; RESCK, M.C.C.; GRECHI, C.O.; BERNARDES, M.T.C.P.; OLIMPIO, F.M.P.; SANTOS, A.M.M.; INCERPI, E.K.; GARCIA, J.A.D. Ascorbic acid for the healing of skin wounds in rats. **Brazilian Journal of Biology**, v.69, n.4, p.1195-1201, 2009.

LIMA, G.R.M.; MONTENEGRO, C.A.; ALMEIDA, C.L.F.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BATISTA, L.M. Database Survey of Anti-Inflammatory Plants in South America: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p.2692-2749, 2011.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v.137, p.473-477, 2008.

LONGUI, C.A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v.83, n.5, p.163-171, 2007.

LOPES, D.M.A.; PINHEIRO, V.G.F.; MONTEIRO, H.S.A.; QUEIROZ, J.A.N.; MADEIRA, L.S.; MÔNICA LOPES, M.M.A. Diagnóstico e tratamento da tuberculose latente em pacientes com doenças inflamatórias crônicas e uso de imunobiológicos inibidores do TNF- α . **Journal Brasileiro Pneumologia**, v.37, n.3, p.308-316, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.

LORENZI, H; SOUZA, V.C. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2008.

LUCENA, P.L.H.; RIBAS FILHO, J.M.; MAZZA, M.; CZECZKO, N.G.; DIETZ, U.A.; CORREA NETO, M.A.; HENRIQUES, G.S.; DOS SANTOS, O.J.; CESCHIN, A.P.; THIELE, E.S. Avaliação da ação da Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirurgia Brasileira**, v. 21 (suplemento 2), p.46-51, 2006.

LYSENKO, L.V. Anti-inflammatory effect of azulene of eucalyptus oil. **Farmakol Toksikol**, v.30, p.341-343, 1967.

MA, W.; QUIRION, R. Inflammatory mediators modulating the transient receptor potential vanilloid 1 receptor: therapeutic targets to treat inflammatory and neuropathic pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.11, n.3, p.307-320, 2007.

MA, W. Chronic prostaglandin E₂ treatment induces the synthesis of the pain-related peptide substance P and calcitonin gene-related peptide in cultured sensory ganglion explants. **Journal of Neurochemistry**, v.115, p.363-372, 2010.

MACDONALD, D.; VANCREY, K.; HARRISON, P.; RANGACHARI, P.K.; ROSENFELD, J.; WARREN, C.; SORGER, G. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.215-221, 2004.

MACGLASHAN, D.Jr. Histamine: A mediator of inflammation. **The Journal of allergy and clinical Immunology**, v.112, n.4, p.53-59, 2003.

MALET-MARTINO, M.; HOLZGRABE, U. NMR techniques in biomedical and pharmaceutical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.55, p.1-15, 2011.

MALHEIROS, F.B.; GARCIA, A.C.G.; SOUZA, L.M.; SILVA, C.A. Efeito cicatrizante do extrato fluido da *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert em fórmulas magistrais semissólidas aplicadas em lesões cutâneas de ratos. **ConScientiae Saúde**, v.10, n.3, p.425-432, 2011.

MALMBERG, A.B., YAKSH, T.L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E₂ and amino acid evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **The Journal of Neuroscience**, v.14, p.2768 – 2776, 1995.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v.78, n.4, p.394-410, 2003.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanism: from the periphery to the brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.34, p.285-309, 2008.

MARQUES, A.H.; CIZZA, G.; STERNBERG, E. Interações imunocerebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.29, p.27-32, 2007.

MARTINS, N.LP.; MALAFAIA, O.; RIBAS-FILHO, J.M.; HEIBEL, M.; BALDEZ, R.N.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, H.; MAZZA, M.; NASSIF, P.A.N.; WALLBACH, T.Z. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, suppl. 3, p.66-75, 2006.

MASUCCI, O. **As plantas como remédio na cura de doenças**. São Paulo: Brasileiros, 1992.

MATTOS, W.M.; CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; RICHETTI, G.P.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-edematogenic effects of velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*: evidence for a selective inhibition of kinin B1 receptor-mediated responses. **Regulatory Peptides**, v.136, n.1-3, p.98-104, 2006.

MATTOS, W.M.; FERREIRA, J.; RICHETTI, G.P.; NIERO, R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties produced by the pregnane compound velutinol A isolated from *Mandevilla velutina*. **Neuropeptides**, v.40, p.125-132, 2006.

MAZZON, E.; CUZZOCREA, S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. **Respiratory Research**, v.8, n.75, p.1-19, 2007.

MENDONÇA, A.C.; FERREIRA, A.S.; BARBIERI, C.H.; THOMAZINE, J.A.; MAZZER, N. Efeitos do ultrassom pulsado de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n.3, fev. 2006.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.257-262, 2009. Revisão.

MENEZES-DE-LIMA JR, O.; KASSUYA, C.A.L.; NASCIMENTO, A.F.Z.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: Implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v.80, p.123-135, 2006.

MEYR, A.J.; SAFFRAN, B. The pathophysiology of the chronic pain cycle. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v.25, p.327-346, 2008.

MEYR, A.J.; STEINBERG, J.S. The physiology of the acute pain pathway. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v.25, p.305-326, 2008.

MIRANDA, F.G.; VILAR, J.C.; ALVES, I.A.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, v.1, n.6, p.1471-2210, 2001.

MONTEIRO, E.C.A.; TRINDADE, J.M.F.; DUARTE, J.L.B.P.; CHAHADE, W.H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINES). **Temas de Reumatologia Clínica**, v.9, n.2, p.53-63, 2008.

MONTENEGRO, M.R.; FRAMCO, M. **Patologia: Processos Gerais**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, p.109-151, 2008.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K.; GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.240, p.337-347, 2009.

MONZOTE, L.; NANCE, MR.; GARCÍA, M.; SCULL, R.; SETZER, W.N. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Communications**, v.6, n.2, p.281-286, 2011.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHAES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.169-177, 2005.

MORSY, T.A.; SHOUKRY, A.; MAZYAD, S.A.; MAKLED, K.D. The effect of the volatile oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Thymus vulgaris* against the larvae of *Lucilia sericata* (Meigen). **Journal of the Egyptian Society of Pharmacology**, v.28, n.2, p.503-510, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MUJICA, A.; JACOBSEN, SVEN-E. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. **Universidad Mayor de San Andrés**, La Paz, v.1, p. 449-457, 2006.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)- induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.1331-1336, 2006.

MURI, E.M.F.; SPOSITO, M.M.M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteróides e sua farmacologia local. Artigo de revisão. **Acta Fisiátrica**, v.16, n.4, p.186-190, 2009.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, n.9, p.997-1007, 2003.

NASCIMENTO, F.R.F.; CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S. MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AZEVEDO, A.P.S.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. **Life Sciences**, v.78, p.2650 – 2653, 2006.

NEUKIRCH, H.; D'AMBROSIO, M.; SOSA, S.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; GUERRIERO, A. Improved anti-inflammatory activity of three new terpenoids derived, by systematic chemical modifications, from the abundant triterpenes of the flowery plant *Calendula officinalis*. **Chemical Biodiversity**, v.2, n.5, p.657-671, 2005.

NITZ, A.C.; ELY, J.B.; d'ACAMPORA, A.J.; TAMES, D.R.; CORRÊA, B.P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.35, n.4, p.74-79, 2006.

NOGUCHI, K.; OKUBO, M. Leukotrienes in Nociceptive Pathway and Neuropathic/Inflammatory Pain. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.34, n.8, p.1163-1169, 2011.

NONATO, F.R.; NOGUEIRA, T.M.O.; BARROS, T.A.A.; LUCCHESI, A.M.; OLIVEIRA, C.E.C.; SANTOS, R.R.S.; SOARES, M.B.P.; VILLARREAL, C.F. Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam.: Evidence for a role of IL-1 α inhibition. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, p.518- 524, 2011.

O'CONNOR, T.M.; O'CONNELL, J.; O'BRIEN, D.I.; GOODE, T.; BREDIN, C.P.; SHANAHAN, F. The role of substance P in inflammatory disease. **Journal of cellular physiology**, v. 201, p. 167-180, 2004.

OLAJIDE, O.A.; AWE.S.O.; MAKINDE.J.K. Pharmacological screening of the methanolic extract of *Chenopodium ambrosioides*. **Fitoterapia**, v.68, p.529-532, 1997.

OLIVEIRA, S.H.P.; CANETTI, C.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB₄ released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. **Inflammation**, v. 31, n.1, p.36-46, 2008.

OLIVEIRA, G.L.; OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADE, L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v.24, n.2, p.571-577, 2010.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.61, n.2, p.255-265, 2011.

OPAL, S.M.; DEPALO, V.A. Anti-inflammatory cytokines. **Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine**, v.117, p.1162-1172, 2000.

OSORNIO, J.J.; KUMAMOTO, J.; WASSER, C. Allelopathic activity of *Chenopodium ambrosioides* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.24, n.3, p.195-205, 1996.

OSSIPOV, M.H.; DUSSOR, G.O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. Review series. **The Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.11, p.3779-3787, 2010.

OTUKI, M.F. LIMA, F.V. MALHEIROS, A.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; YUNES, R.A. CALIXTO, J.B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Science**, v.69, p.2225-2236, 2001.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, p.310-318, 2005.

PAGET, H. The determination of ascaridole in *Chenopodium* oil. **Analyst Journal**, v.51, p.170-176. 1926.

PAPICH, M.G. An update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in Small Animals. **Veterinary Clinic Small Animal**, v.38, p.1243-1266, 2008

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-o-glucoside. **Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v.127, n.8. p.1275-1279, 2007.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.17, p.321-328, 2006.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; DA CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.323-333, 2007.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.8, p.55-68, 2009.

PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G. C.; PEREIRA, P.V.S.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; REBÊLO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.313-319, 2008.

PERAZZO, F. F. Unha de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd) DC.). In: CARVALHO, J., C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 423-430, 2004.

PEREIRA, R.L.C.; IBRAHIM, T.; LUCCHETTI, L.; DA SILVA, A.J.R.; DE MORAES, V.L.G. Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. **Immunopharmacology**, v.43, p.31-37, 1999.

PEREIRA, R.; MEDEIROS, Y.S.; FRODE, T.S. Antiinflammatory effects of *Tacrolimus* in a mouse model of pleurisy. **Transplant Immunology**, v.16, p.105-111, 2006.

PEREIRA, W.S.; RIBEIRO, B.P.; SOUSA, A.I.P.; SERRA, I.C.P.B.; MATTAR, N.S.; FORTES, T.S.; REIS, A.S.; SILVA, L.A.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.602-605, 2010.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M.H.; GEBHART, G.F. Chronic pain and medullary descending facilitation. **Trends in Neurosciences**, v.25, p.319-325, 2002.

QUINLAN, M.B.; QUINLAN, R.J.; NOLAN, J.M. Ethnophysiology and herbal treatment of intestinal worms in Dominica, West Indies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.75–83, 2002.

RADY, J.J.; CAMPBELL, W.B.; FUJIMOTO, J.M. Antianalgesic Action of Nociceptin Originating in the Brain Is Mediated by Spinal Prostaglandin E₂ in Mice. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.296, p.7-14, 2001.

RIBAS, M.O.; SOUZA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L. A. Efeito da *Schinus terebenthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Revista Odonto Ciencia**, v.21, n.53, p.245-252, 2006.

RIBEIRO, S.M.; SERRA, A.C.; GONSALVES, A.M.d'A. Covalently immobilized porphyrins as photooxidation catalysts. **Tetrahedron**, v.63, p.7885–7891, 2007

RIBEIRO, F.A.Q.; GUARALDO, L.; BORGES, J.P.; ZACCHI, F.F.S.; ECKLEY, C.A. Clinical and histological healing of surgical wounds treated with Mitomycin C. **Laryngoscope**, v.114, p.148-152, 2004.

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

RIEWALD, M.; RUF, W. Science review: role of coagulation protease cascades in sepsis. **Critical Care**, v.7, p.123-129, 2003.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Dor: aspectos centrais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.57, p.94-105, 2007.

ROMAN, R.M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK, C.A. Mieloperoxidase e Doença Arterial Coronariana: da Pesquisa à Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.91, n.1, p.12-19, 2008.

ROSA, E.A.; SILVA, B.C.; SILVA, F.M.; TANAKA, C.M.A.; PERALTA, R.M.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; FERREIRA, H.D.; SILVA, C.C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.20.n.4, p.484-488, 2010.

RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1564p.

RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.335-339, 2002.

RUSSO, S.; GRASS, M.Y.; LEICACH, S.R. Efecto de extractos de *Chenopodium album* L. sobre los estados larval y adulto de *Oryzaephilus surinamensis* L. (Coleoptera: Silvanidae). **IDESIA**, v.29, p.51-57, 2011.

SABOURY, A.A.; DIVSALAR, A.; ATAIE, G.; AMANLOU, M.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.A.; HAKIMELAH, G.H. Inhibition study of adenosine deaminase by caffeine using spectroscopy and isothermal titration calorimetric. **Acta Biochimica Polonica**, v.50, n.3, p.849-855, 2003.

SAITO, H.; ISHIGURO, T.; IMANISHI, K.; SUZUKI, I. Pharmacological studies on a plant lectin aloctin A. II. Inhibitory effect of aloctin A on experimental models of inflammation in rats. **Japanese Journal of Pharmacology**, v.32, n.1, p.139-42, 1982.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral response in the mouse. **Neurochemistry International**, v.3, p.271-278, 1996.

SAKURADA, T.; MATSUMARA, T.; MORUYAMA, T.; SAKURADA, C.; UENO, S.; SAKURADA, S. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.75, p.115-121, 2003.

SALANT, W.F.; MITCHELL, C.W. Influence of oil of *Chenopodium* on intestinal contractility. **American Journal Physics**, v.39, p.37-52, 1916.

SALEH, T.S.F.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 331, p. 43-52, 1997.

SALTER, M.W. Cellular signaling pathways of spinal pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, n.6, p. 557-567, 2005.

SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.; LEITE, G.O.; KERNTOPF, M.R.; COSTA, J.G.; ROCHA, J.B.; TOMÉ, A.R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES,

I.R. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.136, n.10, p.504-510, 2011.

SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicina models of pain in mice. **Neuroscience Letters**, v.235, p.73-76, 1997.

SATAKE, H.; KAWADA, T. Overview of the primary structure, tissue distribution, and functions of tachykinins and their receptors. **Current Drug Targets**, v.7, p.963-974, 2006.

SATYAVATI, G.V.; PRASAD, D.N.; DAS, P.K.; SINGH, H.D. Anti-inflammatory activity of *Semecarpus anacardium* Linn. A preliminary study. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.13, p.37-45, 1969.

SAWYNOK, L. Gabaergic mechanisms in antinociception. **Program of Neuropsychopharmacology and Biology Psychiatry**, v.8, p.581-586, 2003.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G.W. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.8, p.93-151, 2006

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Hormônio adrenocorticotrópico; esteroides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: **Goodman & Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw – Hill, p.1241-1261, 2003.

SCHUMACHER, M.A. Transient receptor potential channels in pain and inflammation: therapeutic opportunities. **Pain Practice**, v.10, p.185-200, 2010.

SETTY, A.R.; SIGAL, L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy and side effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v.34, p.773-784, 2005.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.18, p.385-405, 2004.

SHIRASAKI, H.; KANAIZUMI, E.; HIMI, T. Immunohistochemical Localization of the Bradykinin B1 and B2 Receptors in Human Nasal Mucosa. **Mediators of Inflammation**, v.2009, p.1-9, 2009.

SIDDIQUI, I.; BAJWA, R.; JAVAID, A. A new foliar fungal pathogen, *Alternaria Alternata* isolated from *Chenopodium album* in Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v.41, n.3, p.1437-1438, 2009.

SILVA, C.M.; CARVALHO, J.C.T. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). In: CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.323- 325, 2004.

SILVA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; OLIVEIRA, T.M.L.; DINIZ, M.F.F.M. Investigação do Efeito Analgésico Central e Antiinflamatório de *Conocliniopsis prasiifolia* (DC) R.M. King & H. Robinson em Roedores. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.24, n.4, p. 533-537, 2005.

SILVA, R.C.L.; FIGUEIREDO, N.M.A.; MEIRELES, E.B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul: Yendis, 2007.

SILVÉRIO, M.S.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, G.D.; MIRANDA, M.A.; MATHEUS, F.C.; KAPLAN, M.A.C. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.430-435, 2008.

SINGH, K.P.; DWEVEDI, A.K.; DHAKRE, G. Evaluation of antibacterial activities of *Chenopodium album* L. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v.2, n.3, p.398-401, 2011.

SMITH, E.S.J.; BLASS, G.R.C.; LEWIN, G.R.; PARK, T.J. Absence of histamine-induced itch in the African naked mole-rat and "rescue" by Substance P. **Molecular Pain**, v.6, n.29, p.1-6, 2010.

SPEHAR, C.R.; SANTOS, R.L.B.; NASSER, L.C.B. Diferenças entre *Chenopodium quinoa* e a planta daninha *Chenopodium album*. **Planta Daninha**, v.21, n.3, p.487-491, 2003.

SOUZA, D.W.; MACHADO, T.S.L.; ZOPPA, A.L.V.; CRUZ, R.S.F.; GÁRAGUE, A.P.; SILVA, L.C.L.C. Ensaio da aplicação de creme a base de *Triticum Vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em eqüinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.3, p.9-13, 2006.

STEAGALL, P.V.M., MOUTINHO, F.Q., MATOVANI, F.B., PASSARELLI, D., THOMASSIAN, A. Evaluation of the adverse effects of subcutaneous carprofen over six days in healthy cats. **Research in Veterinary Science**, v.86, p.115-120, 2009.

SULAIMAN, M.R.; PADZIL, A.; SHAARI, K.; KHALID, S.; SHAIKMOSSADEQ, W.; SHAHMOHAMAD, A.; AHMAD, S.; AKIRA, A.; ISRAF, D.; LAJIS, N. Antinociceptive activity of *Melicope ptelefolia* ethanolic extract in experimental animals. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1-6, 2010.

TAPPIN, M.R.R.; PEREIRA, J.F.G.; LIMA, L.A.; SIANI, A.C.; MAZZEI, J.L.; RAMOS, M.F.S. Análise química quantitativa para a padronização do óleo de copaíba por cromatografia em fase gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v.27, n.2, p.236-240, 2004.

TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TERRACIANO, S.; AQUINO, M.; RODRIGUEZ, M.; MONTI, M.C.; CASAPULLO, A.; RICCIO, R.; GOMEZ-PALOMA, L. Chemistry and biology of anti-inflammatory marine natural products: molecules interfering with cyclooxygenase, NF-kappaB and other unidentified targets. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n.16, p.1947-1969, 2006.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.179, p. 489-505, 2007.

TRACEY, I., PLOGHAUS, A.; GATI, J.S.; CLARE, S.; SMITH, S.; MENON, R.S.; MATTHEWS, P.M. Imaging attentional modulation of pain in the periaqueductal gray in humans. **The Journal of Neuroscience**, v.22, n.7, p.2748-2752, 2002.

TRATSK, K.S.; CAMPOS, M.M. VAZ, Z.R.; FILHO, V.C.; SCHILEMPER, V. YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Anti-allergic effects and oedema inhibition caused by the extract of *Drymis winteri*. **Inflammation Research**, v.46, n.12, p.509-514, 1997.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammation reactions. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.51, n. 3, p. 443-452, 2007.

UKIYA, M.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; SUZUKI, T.; KIMURA, Y. Anti-Inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. **Journal of Natural Products**, v.69, n.12, p.1692-1696, 2006.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.4, p.631-638, 2007.

VALERIO, E.A.; PINHEIRO, V.C. DE SOUZA. Plantas medicinais e aromáticas. Universidade Estadual de Maringá. Programa desenvolvimento educacional – PDE. Maringá, 2008/2009. Disponível em: <www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/2102-6.pdf>. Acesso em: 20 de Maio de 2010.

VALLANCE, P.; CHAN, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart (British Cardiac Society)**, v.85, p.342-350, 2001.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of Pain. **The Medical Clinics of North America**, v.91, p.1-12, 2007.

VANEGAS H.; SCHAIBLE, H. G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Program and Neurobiology**, v.64, p.327-363, 2001.

VARGAS, N.R.C.; COELHO, F.S.; MENDIETA, M.C.; SOUZA, A.D.Z.; HAEFFNER, R.; HECK, R.M.; CEOLIN, T.; LOPES, C.V. Plantas medicinais utilizadas para cicatrização de feridas pelos produtores rurais de agricultura de base ecológica do sul do Rio Grande do Sul. CIC, 18., ENPOS, 11., Amostra científica 1, 2009, Pelotas. Disponível em: <www.ufpel.edu.br/cic/2009/cd/pdf/CS/CS_00189.pdf>. Acesso em: 25 de Maio de 2010.

VELAZQUEZ, K.T.; MOHAMMAD, H.; SWEITZER, S.M. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. **Pharmacology Research**, v.55, n.6, p.578-89, 2007.

VERRI JR, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.

VIANNA, R.M.; CALIXTO, J.B. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-BK in mouse pleurisy. **British Journal of Pharmacology**, v.123, p.281-291, 1998.

VIEIRA, L.S. **Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992.

VIEIRA, S.C.; KRAUSE, G.A.; ZAMPIROLO, J.A.; LUCINDA, R.M.; SCHLEMPER, V.; SCHLEMPER, S.R.M. Efeito cicatrizante da pomada de *Persea cordata* Mez (Lauraceae) em feridas cutâneas de cobaias. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.3, n.2, p.31-35, 2001

XIE, W.; STRONG, J.A.; MEIJ, J.T.A.; ZHANG, J.M.; YU, L. Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger. **Pain**, v.116, p.243-256, 2005.

WANG, S.; DAI, Y.; FUKUOKA, T.; YAMANAKA, H.; KOBAYASHI, K.; OBATA, K.; CUI, X.; TOMINAGA, M.; NOGUCHI, K. Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. **Brain**, v.131, p.1241-1251, 2008.

WEBER, C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **Journal of Molecular Medicine**, v.81, n.1, p.4-19, 2003.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, C.W. Carrageenan-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v.111, p.544-547, 1962.

WITZENRATH, M.; GUTBIER, B.; OWEN, J.S.; SCHMECK, B.; MICHELL, T.J.; MAYER, K.; THOMAS, M.J.; ISHII, S.; ROSSEAU, S.; SUTTORP, N.; SHUTTE, H. Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. **Critical Care Medicine**, v.35, n.7, p.1756-1762, 2007.

YADAV, N.; VASUDEVA, N.; SINGH, S.; SHARMA, S.K. Medicinal properties of genus *Chenopodium* Linn. **Natural Product Radiance**, v.6, n.2, p.131-134, 2007.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by a selective eicosanoid inhibitor: a double-edged sword? **Pharmacological Sciences**, v.28, n.9, p.459-464, 2007.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear oedema. **Journal of Investigative Dermatology**, v.80, p.48-52, 1983.

YOUNG, J.M.; SPIRES, D.A.; BEDORD, C.J.; WAGNER, B.; BALLRON, S.J.; DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v.82, p.367- 371, 1984

ZANINI, J.C.; MEDEIROS, Y.S.; CRUZ, A.B.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Actions of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Phytoterapy Research**, v.6, p.1-5, 1992.

ZEGARSKA, B.; LELINSKA, A.; TYRAKOWSKI, T. Clinical and experimental aspects of cutaneous neurogenic inflammation. **Pharmacological Reports**, v.58, n.1, p.13-21, 2006.

ZEILHOFER, U.H. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**, v.73, p.165 – 174, 2007.

ZHOU, H.; DENG, Y.; XIE, Q. The modulatory effects of the volatile oil of ginger on the cellular immune response in vitro and in vivo in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.301-305, 2006.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, n.2, p.109-110, 1983